

Série A, n° 1023
N° d'ordre : 1047

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(mention Sciences)

par

Madame COUSIN Denise

PREMIÈRE THÈSE

“ Etude d'un prophage défectif de la souche B d'Escherichia Coli ”

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

soutenues le 6 Juin 1963 devant la Commission d'Examen

MM. LWOFF

Président

L'HERITIER
SCHAEFFER

} Examinateurs

Série A, n° 1023

N° d'ordre : 1047

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(mention Sciences)

par

Madame COUSIN Denise

PREMIÈRE THÈSE

“ Etude d'un prophage défectif de la souche B d'Escherichia Coli ”

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

soutenues le 6 Juin 1963 devant la Commission d'Examen

MM. LWOFF

Président

**L'HERITIER
SCHAEFFER**

} Examinateurs

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen **M. ZAMANSKY**

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure	COUTEAUX	T Biologie Animale (P. C. B.)
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparée	MAY	T Zoologie (Orsay)
GRASSE	T Evolution des êtres organisés	CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie
PREVOST	T Chimie organique	FELDMANN	T Biologie Végétale Marine
WYART	T Minéralogie et Cristallographie	GUINIER	T Physique des Solides (Orsay)
TEISSIER	T Zoologie	JOST	T Physiologie comparée
MANGENOT	T Biologie Vég. (Orsay)	FORTET	T Calcul des Probabilités et Physique Math.
AUGER	T Physique quantique et Relativité	SCHARTZ	T Calcul différentiel et Intégral
MONNIER	T Physiologie Générale	CHOUARD	T Physiologie Végétale
PIVETEAU	T Paléontologie	MALAVARD	T Aviation (Techn. Aéronaut.)
ROCARD	T Physique (E. N. S.)	BRELOT	T Calcul différentiel et intégral
CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.)	NORMANT	T Chimie Organique
LAFFITTE	T Chimie Générale	BENARD	T Chimie Minérale
FAVARD	T Géométrie supérieure	BUVAT	T Botanique (E. N. S.)
COULOMB	T Physique du Globe	DUGUE	T Statistiques Mathématiques
Mlle COUSIN	T Biologie Animale (S. P. C. N.)	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
CHRETIEN	T Chimie minérale	ULRICH	T Physiologie Végétale
DRACH	T Zoologie	MARECHAL	T Optique théorique et Appl.
KASTLER	T Physique (E. N. S.)	KIRRMANN	T Théories Chimiques
EPHRUSSI	T Génétique	CHADEFAUD	T Botanique
RIVIERE	T Géologie (S. P. C. N.) et sédim.	Mlle LE BRETON	T Physiologie de la Nutri.
GAUTHERET	T Biologie Végétale (P. C. B.)	SALEM	T Mathématiques générales
LUCAS R.	T Recherches Physiques	LELONG	T Applic. de l'analyse à la Géométrie
THOMAS A.	T Biologie cellulaire	DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparée
ARNULF	T Optique appliquée	EHRESMANN	T Topologie Algébrique
MORAND	T Physique Enseignement	FRANÇON	T Physique (S. P. C. N.)
SOLEILLET	T Physique (P. C. B.)	GLANGEAUD	T Géographie physique et géologie dynamique
FORTIER	T Mécan. expérimentale des fluides	GODEMENT	T Mathématiques (M. P. C.)
DANJON	T Astronomie	PISOT	T Techn. Mathém. de la Phys.
PETIT	T Biologie maritime	ROCH	T Géologie
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique	SCHATZMAN	T Astrophysique
GALLIEN	T Embryologie	TERMIER	T Paléontologie stratigraphique
EICHHORN	T Botanique	ZAMANSKY	T Mathématiques générales
DE CUGNAC	T Biologie Végétale (S. P. C. N.)	LENNUIER	T Physique (M. G. P.)
Mlle CAUCHOIS	T Chimie Physique	RIZET	T Génétique
THELLIER	T Physique du Globe	ROUTHIER	T Géologie appliquée
L'HERITIER	T Biologie Générale (Orsay)	Mme TONNELAT	T Physique Théorique
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay)	DIXMIER	T Mathématiques (M. P. C.)
PONCIN	T Mécanique Générale	SOUCHAY	T Chimie générale
DUBREIL	T Arithmétique et Théorie des Nombres	AIGRAIN	T Electrotechnique générale
QUELET	T Chimie Organique	BRUSSET	T Chimie systématique
CAGNIARD	T Géophysique appliquée	M. LEVY	T Physique théor. des hautes Energies (Orsay)
CHAMPETIER	T Chimie Macromoléculaire	Mme CHAIX	T Chimie biologique
CUVILLIER	T Micropaléontologie	Mme HUREL-PY	T Biologie Végétale (P. C. B.)
JUNG	T Pétrographie	PIAUX	T Chimie (M. P. C.)
TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique	BRUN	T Mécan. théorique des fluides
WIEMANN	T Chimie organique et struct.	LEDERER	T Chimie biologique
JACQUINOT	T Spectroscopie et Physique Céleste (Orsay)	Mme DUBREIL	T Mathématiques (Agrégation)
VASSY	T Physique de l'Atmosphère	Mme LELONG	T Mathématiques II (E. N. S.)
DESTOUCHES	T Théories Physiques	BELLAIR	T Géologie (S. P. C. N.)
AMIEL	T Chimie Générale	COTTE	T Physique électricité
HOCART	T Minéralogie et Cristallographie	DUBOIS J. E.	T Chimie organique
J. P. MATHIEU	T Physique (Optique)	LAMOTTE	T Zoologie (E. N. S.)

MICHEL A.	T Chimie Minérale (Orsay)	FREON	T Chimie organique (Orsay)
OLMER	T Energétique générale	HELLER	T Physiologie végétale
ROUAULT	T Electricité (Orsay)	TORTRAT	T Calcul des Probabilités
GAUTHIER	T Mécanique appliquée	CAILLEUX	Géologie (S. P. C. N.)
BARCHEWITZ	T Chimie Physique	MAGNAN	T Physique (S. P. C. N.)
BROSSEL	T Physique atomique	DAUDEL	T Mécanique Ondulatoire appliquée à Chimie théorique et à la Physique nucléaire
BUSER	T Physiologie comparée		Biologie Végétale (S. P. C. N.)
CAMUS	T Physiologie végétale (B. M. P. V.)	Mlle FOURCROY	T Mécanique Analytique et Mécanique Célestes
CASTAING	T Physique II Thermod. (Orsay)	Mme CHOQUET-BRUHAT	Physiologie Générale
CURIEN	T Minéralogie et Cristallographie	Mlle VEIL	T Microbiologie
MOYSE	T Physiologie végét. (Orsay)	LWOFF	T Mécanique Physique et Expérimentale
NOIROT	T Evolution des êtres organisés	SIESTRUNCK	T Métallurgie des métaux nucléaires
PANNETIER	T Chimie générale	LACOMBE	T Physique P. C. B. (Orsay)
POSSOMPES	T Zoologie	BROCHARD	T Mécanique générale
PULLMANN	T Chimie quantique	CABANNES	T Mathématiques I (Orsay)
TEILLAC	T Physique Nucléaire et Radioactivité	LESIEUR	T Mécanique générale (Orsay)
TONNELAT	T Biologie physico-chim.	MAZET	Géographie Physique et Géol. dynamique
VILLE	T Econométrie	CAIRE	T Mécanique des Fluides
WILLEMART	T Chimie (P. C. B.)	COMOLET	Physiologie Animale (Orsay)
DODE	T Chimie (Orsay)	CORABŒUF	Physique de l'Exosphère
FREYMANN	T Recherches Physiques	DELLOUE	Botanique II (Orsay)
GUINOCHE	T Biologie vég. (S. P. C. N.) (Orsay)	GORENFLOT	Biologie Animale (P. C. B.)
ROLLET	T Chimie minérale	HOUILLO	Chimie (S. P. C. N.) (Orsay)
Mlle JOSIEN	T Chimie (S. P. C. N.)	JULLIEN J.	T Tech. Math. de la Physique (Orsay)
CHEVALLEY	T Géomét. algébrique et théorie des groupes	MALGRANGE	Antropologie
ARNOULT	T Electronique (Orsay)	OLIVIER	T Botanique II (Orsay)
CHAPELLE	T Physique (Orsay)	NOZERAN	T Physique (E. N. S.) (Orsay)
DELANGE	T Mathématiques I (Orsay)	BLANC-LAPIERRE	T Botanique (Orsay)
DENY	T Mathématiques générales (Orsay)	CHEVAUGEON	T Mathématiques (Orsay)
GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides	KAHANE	T Mathématiques (E. N. S.) féminines
LUCAS G.	T Géologie	SAMUEL	T Astronomie (Orsay)
ALLARD	T Chimie Physique	KOURGANOFF	T Mécanique céleste
BERTHELOT	T Physique des particules Fond.	THIRY	Physique (S. P. S. C. N.)
BRICARD	T Météorologie et Physique de l'Atmosphère	ABELES	Physique (P. C. B.)
Mme ALBE-FESSARD	T Psychophysiologie	AMAT	Géologie
FRIEDEL	T Physique des Solides (Orsay)	AUBOIN	Physique Nucléaire et Radioactivité
M. JULIA	T Etude des Moléculaires naturel. complexes	Mme BENOIT-GUEUTAL	Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)
LENDER	T Biologie Animale (S. P. C. N.) Orsay	BOUGIS	T Mathématiques (M. P. C.)
MAGAT	T Physico-chimie des radio-éléments	BRUHAT	T Géologie historique (Orsay)
Mlle QUINTIN	T Electrochimie	BRUNN	Physique (M. G. P.) (Orsay)
MONOD	T Chimie du métabolisme	CHABBAL	T Mathématique Propé. (Orsay)
BENOIT	T Physiologie Animale (Orsay)	DEHEUVELS	Physique théorique (Orsay)
DE POSSEL	T Analyse numérique	D'ESPAGNAT	Géologie (S. P. C. N.)
CHARLOT	T Chimie analytique	FURON	T Génétique
LEMEE	T Physiologie Végét. B. M. P. V. (Orsay)	Mme GANS	Biologie végétale (P. C. B.)
GUERIN	T Chimie (M. P. C.) (Orsay)	GENEVES	Physique (C. U. S. Orléans)
CHATELET M.	T Chimie (P. C. B.)	GUILBERT	Pétrographie
JEAN	T Physique Nucléaire (Orsay)	HUPE	T Biologie générale
MATTLER	T Physique (S. P. C. N.)	HOLLANDE	T Analyse numérique
BERGERARD	T Zoologie (Orsay)	LIONS	Chimie (P. C. B.)
BERTIN	T Electronique (Orsay)	MAITTE	Physique Propédeutique
BOUSSIÈRES	Chimie des Radioéléments (Orsay)	MEYER	Géologie appliquée
Mme COUTURE	T Thermodynamique et Mécanique Physique	NICOLAS	Biologie générale
ELLENBERGER	T Géologie des grandes régions du globe	PANIGEL	Pétrographie
FRANC	T Biologie Animale (P. C. B.)	RAVIER	T Mécanique théorique des fluides
SCHNELL	Botanique tropicale (Orsay)	ROSEAU	Electronique
STOLKOWSKI	T Physiologie végétale	ROUBINE	T Chimie (P. C. B.)
ACHER	Chimie Biol. (Orsay)	SILBER	T Electronique
BAUDOIN	Biologie Animale (P. C. B.)	UEBERSFELD	T Théories Physiques
BEAUMONT	Biologie Animale (S. P. C. N.)	YVON	
BLAMONT	T Géophysique Ionosphère		
BOURREAU	Botanique		
CURIE D.	Physique (M. G. P.)		
DURAND-DELGA	T Géologie		

INTRODUCTION

L'étude des relations entre bactériophages et bactéries a permis de classer les bactériophages en deux grandes catégories distinctes. Dans un premier cas, les bactéries infectées ne survivent pas à l'infection par le bactériophage qui, après s'être multiplié, est libéré par la lyse de la bactérie hôte. Ces bactériophages sont qualifiés de virulents. Les bactériophages de la série T, actifs sur Escherichia Coli B appartiennent à cette catégorie. Ils ont fait l'objet des études classiques de Delbrück (1946), Luria (1953), Hershey (1957) et de leurs écoles.

Dans le second cas, l'infection par un bactériophage n'aboutit pas nécessairement à la mort des bactéries infectées. Une certaine fraction de celles-ci survit et devient lysogène. Ces bactéries perpétuent héréditairement le pouvoir de produire du bactériophage en l'absence de toute nouvelle infection (Lwoff 1953). Les bactériophages qui sont capables de donner naissance à des systèmes lysogènes sont qualifiés de tempérés (Jacob, Lwoff, Siminovitch et Wollman 1953).

La lysogénie correspond donc à une association permanente, au niveau intra-cellulaire, entre le bactériophage et la bactérie. Chez les bactéries lysogènes le bactériophage est perpétué sous une forme non infectieuse à laquelle Lwoff et Gutmann (1950) ont donné le nom de prophage. Aussi longtemps que le bactériophage reste à l'état de prophage, sa présence est sans effet sur la survie et la reproduction de la bactérie hôte. Dans une faible

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550201_0026

fraction des bactéries d'une population lysogène, cependant, le bactériophage passe de l'état prophage à l'état végétatif et la bactérie dans laquelle ce développement survient se lyse et libère dans le milieu des bactériophages infectieux. Le pouvoir de produire des bactériophages est donc une propriété potentielle des bactéries lysogènes puisque la production de bactériophages aboutit à la lyse de la bactérie productrice. Chez certaines souches de bactéries lysogènes, cette production spontanée ne peut être influencée de manière sensible par des facteurs extérieurs. De telles souches lysogènes sont dites non inductibles. Dans d'autres cas, au contraire, la production de bactériophages peut être induite à volonté par des agents physiques ou chimiques (Lwoff, Siminovitch et Kjeldgaard 1950). Ces souches lysogènes sont appelées inductibles. Le caractère inductible ou non inductible d'une souche lysogène est déterminé par le prophage qu'elle perpétue. Le cycle d'un bactériophage tempéré chez une souche lysogène inductible est représenté sur la figure 1.

La présence d'un prophage chez une bactérie lysogène confère à celle-ci une résistance spécifique à une surinfection par un bactériophage homologue ou apparenté au bactériophage qu'elle est capable de produire. Cette propriété, l'immunité, est donc très différente de la non réceptivité ou résistance à un bactériophage, due à l'absence de récepteur spécifique à la surface de la bactérie.

Dans certains cas, la présence d'un prophage modifie d'autres propriétés de la bactérie. Elle peut, en particulier, interférer avec la reproduction de bactériophages non apparentés au bactériophage homologue.

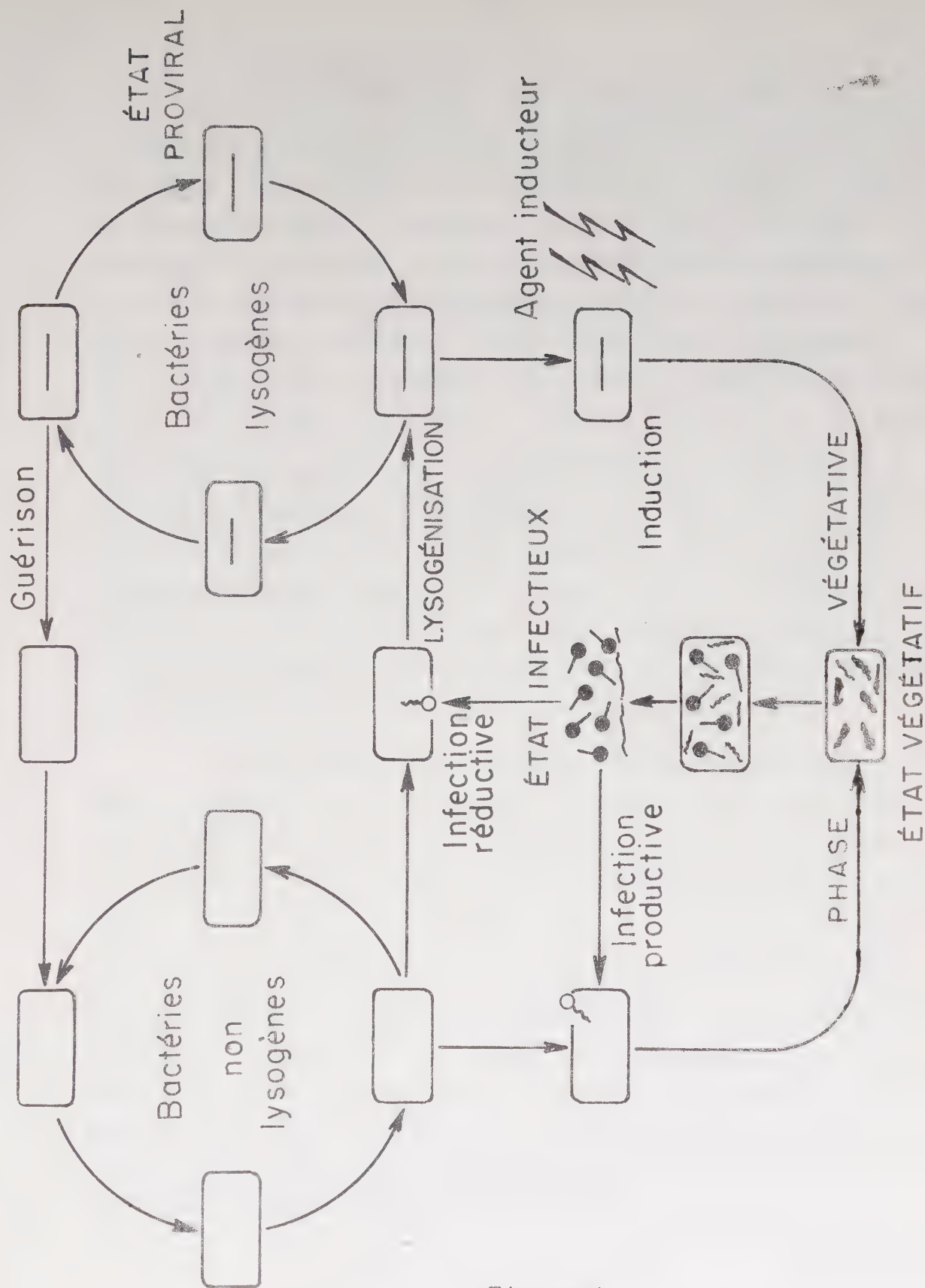


Figure 1

Représentation schématique du cycle du bactériophage chez les bactéries lysogènes (d'après Lwoff, 1953)

Production de bactériophages et immunité sont les propriétés caractéristiques des bactéries lysogènes. Elles permettent de distinguer ces bactéries des bactéries non lysogènes et sensibles correspondantes. Certaines mutations du prophage peuvent cependant survenir, qui affectent l'une quelconque des étapes du développement du bactériophage. De telles souches lysogènes défectives ne produisent plus (ou produisent très peu) de bactériophages infectieux. Elles conservent cependant leur immunité spécifique envers le bactériophage homologue. L'étude d'une variété de souches lysogènes défectives, obtenues expérimentalement à partir d'une même souche lysogène normale, a montré que ces souches défectives différaient les unes des autres selon la nature de la lésion génétique induite dans le prophage (Jacob, Fuerst et Wollman, 1957). On conçoit, par conséquent, qu'il puisse être très difficile d'établir le caractère lysogène d'une souche isolée d'un milieu naturel, si cette souche est une souche lysogène défective.

Les recherches qui font l'objet du présent exposé portent sur la souche B d'*Escherichia coli*. Cette souche présente un intérêt particulier car elle est utilisée dans un très grand nombre de laboratoires et elle a servi, entre autres, aux multiples travaux sur les bactériophages virulents de la série T. Cette souche est sensible à un grand nombre de bactériophages, et le fait qu'elle pût être lysogène n'avait jamais été soupçonné. En effet, comme nous le verrons ultérieurement, on n'a jamais pu mettre en évidence la présence de bactériophage dans le milieu de culture d'*E. coli* B. Or, et c'est l'objet du présent travail, la souche B d'*E. coli* est lysogène et porte un prophage défectif.

Parmi les bactériophages auxquels la souche B d'E. coli est sensible, se trouvent les bactériophages tempérés P_1 et P_2 , qui ont été originellement isolés de la souche lysogène Lisbonne d'E. coli (Bertani 1951). Ayant infecté E. coli B par un mutant virulent du bactériophage P_2 , Bertani (1957) découvrit dans le lysat ainsi obtenu un nouveau type de phage qui forme des plages troubles au lieu de plages claires comme le type original, et qui confère une immunité différente de celle conférée par P_2 .

La génétique des bactériophages tempérés a été bien étudiée (Jacob et Wollman 1957, Bertani 1958). Des mutations ont été décrites, qui affectent les différentes propriétés que l'on peut reconnaître à ces bactériophages. Cependant, des mutations affectant le type d'immunité spécifique conférée par un bactériophage tempéré n'avaient encore jamais été décrites. Or les bactéries lysogènes pour le nouveau phage isolé par Bertani étaient sensibles au bactériophage P_2 , et réciproquement les bactéries lysogènes pour P_2 étaient sensibles au nouveau type de phage. Ce phage fut tout d'abord considéré comme un mutant d'immunité du bactériophage P_2 et fut par conséquent appelé P_2 dismun (Bertani 1957).

Etant donné l'intérêt présenté par ce type de phage exceptionnel, j'ai, sur les conseils du Dr. Bertani, entrepris des études pour en déterminer l'origine. Ainsi qu'on pourra le voir dans la suite de cet exposé, les résultats obtenus ont conduit à réviser l'hypothèse émise initialement. Le variant "dismun" qui apparaît dans les lysats du bactériophage P_2 préparé sur E. coli B, proviendrait en réalité d'une recombinaison génétique entre

le bactériophage P_2 infectant et un prophage défectif porté par les bactéries *E. coli* B et conférant à celles-ci une immunité spécifique, différente de celle qui est conférée par le bactériophage P_2 .

o

o o

Un premier chapitre groupera les renseignements concernant le matériel utilisé, la nomenclature adoptée ainsi que les techniques mises en oeuvre.

Dans un second chapitre, seront étudiées les conditions d'apparition du variant "dismun" au cours de l'infection des bactéries *E. coli* B par le bactériophage P_2 . Les propriétés de ce variant et celles du bactériophage P_2 seront comparées. Cette étude conduira à formuler l'hypothèse selon laquelle le variant examiné proviendrait en réalité d'une recombinaison génétique entre le bactériophage P_2 et un prophage X, présent dans les bactéries d'*E. coli* B. L'analyse quantitative de l'apparition du variant apportera de nouveaux arguments en faveur de cette hypothèse. Ces résultats justifient donc l'appellation " P_2 Hybride" (P_2 Hy) qui sera dorénavant employée pour désigner le variant dismun.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude du prophage X. Les méthodes utilisées pour isoler des bactéries B dépourvues du prophage X seront décrites. Le fait que l'on puisse obtenir de telles bactéries $B(X)^-$ justifie

l'hypothèse qu'il existe dans les bactéries originales $B(X)^+$ une unité X, douée de continuité génétique. Les propriétés des bactéries $B(X)^+$ et $B(X)^-$ seront comparées. Cependant, toutes les tentatives faites pour déceler la présence de bactériophages correspondant au prophage X étant demeurées infructueuses, la conclusion est atteinte que le prophage X est un prophage défectif. Cette conclusion est renforcée par l'analyse des bactériophages formés lorsqu'on infecte des bactéries $B(X)^+$ par différents types de bactériophages P_2 . Ces expériences indiquent que le défaut du prophage X est important et qu'il s'agit vraisemblablement d'un défaut quantitatif, c'est-à-dire d'une délétion d'un segment de matériel génétique.

L'étude comparée des densités des bactériophages P_2 et P_2 Hybride dans des expériences d'ultra-centrifugation font l'objet du chapitre 4. Cette étude révèle d'une part que les bactériophages P_2 Hybride ont une densité supérieure à celle des bactériophages P_2 , et d'autre part que la densité des différentes souches de bactériophages P_2 Hybride semble être la même. La signification de ces résultats est discutée.

La localisation génétique du prophage X est étudiée dans le chapitre 5 par des croisements réciproques entre bactéries porteuses de X et bactéries qui en sont dépourvues. Les expériences montrent que le prophage X ségrège dans les croisements et qu'il est lié aux marqueurs qui gouvernent la biosynthèse de l'histidine.

L'ensemble de ces expériences démontre donc que les bactéries de la souche B classique d'E. coli sont porteuses d'une unité douée de continuité génétique, le prophage X. Ce prophage est un prophage défectif qui confère aux bactéries B une immunité spécifique et qui est capable

de donner lieu à une recombinaison génétique avec le bactériophage P_2 auquel il semble donc apparenté. Ce prophage est localisé sur le chromosome bactérien. La signification de ces résultats sera discutée ainsi que le rôle que la présence du prophage X pourrait jouer dans différents phénomènes qui ont été observés chez les bactéries de la souche B d'E. coli et chez différents mutants de cette souche.

o

o o

Ce travail a été entrepris et réalisé en grande partie sous la direction du Docteur G. Bertani, tout d'abord à l'Institut de Technologie de Californie, puis à l'Université de Californie du Sud. Je tiens à exprimer ici toute ma reconnaissance au Professeur Bertani qui m'a initiée à la recherche et guidée avec une permanente sollicitude au cours du travail poursuivi dans son laboratoire. J'ai été également beaucoup aidée par les nombreuses discussions avec les chercheurs de son groupe, en particulier E.L. Bertani et E. Six.

A mon retour en France, le Professeur Coursaget m'a fait la faveur de m'accueillir dans son service de Biologie du Commissariat de l'Energie Atomique de Saclay. C'est dans ce laboratoire que j'ai réalisé les expériences d'ultra-centrifugation, grâce à René Cohen que je remercie vivement pour son active collaboration,

Enfin, c'est dans le service du Professeur A. Lwoff, à l'Institut Pasteur, que j'ai pu acquérir et mettre en oeuvre mes premières notions de génétique bactérienne. Le patient enseignement du Docteur E. Wollman, la bienveillance inépuisable avec laquelle il a toujours considéré mes problèmes, non seulement m'ont permis d'obtenir mes premiers résultats dans ce domaine, mais encore m'ont communiqué un ardent intérêt pour cette discipline. J'ai pu aussi dans ce service, tirer grand profit des avis pertinents du Docteur F. Jacob.

Mais je ne saurais terminer cette page de remerciements sans demander à Jean Weigle d'accepter que je dise ici combien son amicale attention m'a été précieuse tout au long de ce travail. En effet, depuis mes débuts jusqu'au jour présent, il n'a cessé de me prodiguer ses conseils, ses encouragements, ses suggestions fructueuses. Et si je puis persévérer dans la voie, parfois difficile, de la recherche, je le devrai beaucoup à la confiance qu'il a su me donner à travers son amitié,

Je voudrais remercier également Messieurs les Professeurs Lwoff, L'Héritier et Schaeffer qui m'ont fait l'honneur de composer le jury devant lequel cette thèse a été soutenue.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

L'essentiel de ce travail porte sur les relations du bactériophage P_2 et de variants de ce phage avec la souche B d'E. coli. Nous décrirons donc dans ce chapitre les souches de phages et de bactéries utilisées dans cette étude, ainsi que les méthodes employées. Il nous a semblé préférable de décrire dans les chapitres correspondants, d'une part les méthodes d'études par ultra-centrifugation de la densité des bactériophages (chapitre IV) et d'autre part les souches et les méthodes utilisées dans les croisements bactériens (chapitre V).

SOUCHES DE BACTERIES ET DE BACTERIOPHAGES

La souche d'E. coli "Lisbonne" isolée par Lisbonne et Carrère (1922) produit plusieurs types de bactériophages (Bordet 1925). L'un d'entre eux a été appelé P_2 par Bertani (1951) ; il est identique aux phages H^+ de Beumer et Beumer Jochmans (1952) et α de Frédéric (1953). La souche indicatrice généralement utilisée pour l'étude du bactériophage P_2 est une souche de Shigella dysenteriae (Bertani 1951), communément désignée par le symbole Sh. Par étalement sur bactéries Sh, le phage P_2 forme des plages de 1 à 4 mm de diamètre dont les contours sont irréguliers. Une auréole trouble présente quelques anneaux concentriques correspondant à des intensités de turbidité différentes. Au centre de la zone

claire, des colonies isolées de bactéries lysogènes et de bactéries résistantes apparaissent secondairement.

La présence de calcium est nécessaire à l'adsorption du phage P_2 dans les bactéries indicatrices. (Bertani 1953 a),

Si la souche Sh de *Shigella dysenteriae* est celle sur laquelle on obtient la meilleure efficacité d'étalement du bactériophage P_2 et celle sur laquelle la morphologie des plages est la plus aisée à observer, le bactériophage P_2 est également actif sur les souches B, C et K12 d'*E. coli*.

Cependant, lorsqu'un lysat du phage P_2 , préparé sur *Shigella*, est étalé comparativement sur bactéries Sh et sur bactéries B, une fraction seulement, de l'ordre de 10^{-5} , des phages qui forment des plages sur bactéries Sh, forment également des plages sur bactéries B. Lorsque les plages formées sur *E. coli* B sont prélevées et que les phages qu'elles contiennent sont étalés sur bactéries Sh et sur bactéries B, le même nombre de plages est formé sur chacun des deux types de bactéries. Il suffit cependant d'un passage sur bactéries Sh pour que les phages issus de ces bactéries perdent leur pouvoir de former des plages sur bactéries B. En effet, si les plages formées sur *Shigella* sont prélevées et que les phages qu'elles contiennent sont à nouveau dénombrés sur bactéries Sh et sur bactéries B, il y a environ 10^5 fois plus de phages sur bactéries Sh que sur bactéries B. Ce phénomène a été décrit (Weigle et Bertani 1953 - Bertani et Weigle 1953) sous le nom de "variations des bactériophages conditionnées par les bactéries hôtes" et a été étudié par ces auteurs d'une part avec le bactériophage P_2 et les souches Sh et *E. coli* B, d'autre part

avec le bactériophage λ et les souches d'E. coli K12* et C. Ce phénomène est représenté schématiquement sur la figure 2.

Il était important de décrire d'emblée ce phénomène puisque, dans la suite de cet exposé nous aurons à comparer constamment le développement du bactériophage P_2 dans les bactéries Sh et dans les bactéries B et que l'existence de ce phénomène de "variation conditionnée par l'hôte" complique singulièrement les expériences et l'exposé des résultats obtenus.

Le système dont nous nous occupons ayant été présenté, nous allons passer brièvement en revue les différentes souches de bactéries et de bactériophages utilisées.

Souches bactériennes

Les souches Sh de *Shigella dysenteriae* et B d'E. coli proviennent du laboratoire de Bertani. Dans un grand nombre d'expériences on a utilisé des dérivés de ces souches résistantes à la streptomycine (exemple Sh Sm^r est une souche Sh résistante à la streptomycine). Les souches lysogènes sont représentées suivant la nomenclature habituelle : Sh (P_2) est une souche Sh lysogène pour le bactériophage P_2 .

Comme on le verra dans la suite de cet exposé, la souche B classique d'E. coli porte un prophage défectif, le prophage X. Cependant, à partir de cette souche, désignée $B(X)^+$, on a pu isoler des variants ne portant plus ce prophage et que nous désignerons par le symbole $B(X)^-$ pour les distinguer du type sauvage qui est communément appelé E. coli B. Un certain nombre de souches B, provenant de différents laboratoires ont été également examinées. La

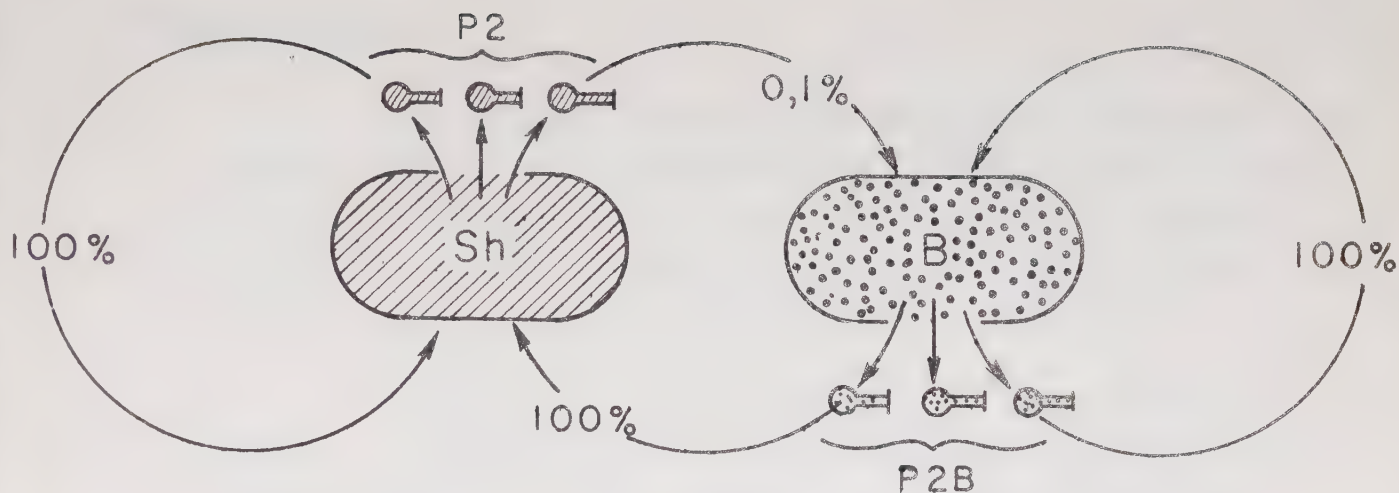


Figure 2

Représentation schématique du développement du bactériophage P2 dans *Shigella dysenteriae* d'une part et dans *Escherichia coli* B d'autre part. (d'après Bertani et Weigle, 1953). Les chiffres indiquent l'efficacité d'étalement (en %) , sur chacune des souches indicatrices, des phages produits par l'un ou l'autre type de bactérie.

plupart de ces souches ont une origine commune mais présentent entre elles certaines différences. Le tableau I rassemble ces différentes souches.

Les souches utilisées dans les croisements bactériens seront décrites ultérieurement (voir chapitre V).

Bactériophages

La plupart des bactériophages utilisés dans ce travail dérivent du bactériophage P_2 dont la description a été faite ci-dessus. Il peut s'agir soit de mutants spontanés du bactériophage P_2 , soit "d'hybrides" entre le bactériophage P_2 et le prophage X d'E. coli B.

Mutants du bactériophage P_2 . Les mutants du phage P_2 proviennent de la collection de G. Bertani. Certains diffèrent du type sauvage par la morphologie de leurs plages (Bertani 1953 a). C'est ainsi que P_{2rd} forme des plages beaucoup plus arrondies que celles de P_2 sauvage et que les plages de P_{2rd1} sont arrondies mais de diamètre plus grand que celui des plages de P_{2rd} . Certains mutants forment des plages claires sur bactéries indicatrices. Celles de P_{2c} ont un centre clair entouré d'une auréole plus trouble. Il s'agit d'un mutant tempéré, capable de lysogéniser quoiqu'à une fréquence beaucoup plus faible que P_2 sauvage. Les bactéries lysogènes $Sh(P_2)$ sont immunes à P_{2c} .

D'autres mutants clairs, appelés P_{2vir} , sont incapables de lysogéniser. Certains d'entre eux sont capables de surmonter, quoiqu'à des degrés divers, l'immunité de bactéries lysogènes $Sh(P_2)$ (Bertani 1953 b et c).

TABLEAU I

Souches d'*Escherichia coli* B.

Souches	Propriétés	Origine
B type sauvage		Delbrück et Luria (1942) (obtenue de G. Bertani)
B Berkeley (BB)	Les mutants de type r_{II} et r_{III} du phage T4 forment des plages de type r^+ sur cette sou- che.	Mac Fall et Stent (1958)
BB $mal^+ \lambda$ s	Souche BB rendue sen- sible à λ par trans- duction.	Arber et Lataste Dorolle (1961)
B 90 H	Mutant de B $lac^+ arg$ $his Sm^r$	Maas (1962)
B 609	Mutant de B $his try$	de Haan (1954)
B/r	Mutant de B résistant aux radiations X	Witkin (1947)
Bs	Mutant de B sensible aux radiations X et UV.	Hill (1958)
B Bordet		Collection de l'Ins- titut Pasteur.

Des bactéries Sh(P_2) portant un seul prophage sont immunes à P_2 vir1, mais sont lysées par P_2 vir6, alors que des bactéries doublement lysogènes sont immunes envers P_2 vir6 mais sont lysées par P_2 vir3.

Le mutant virulent P_2 rd2vir19, obtenu à partir d'un mutant rd, mérite une mention particulière. Il forme des plages troubles sur les bactéries de la souche C d'E. coli et est capable de les lysogéniser, alors qu'il forme des plages claires sur bactéries Sh qu'il est incapable de lysogéniser (Bertani, L.E. 1960).

Enfin, un mutant de P_2 qui n'exige pas la présence de calcium pour son adsorption (Bertani G, résultats non publiés) a également été utilisé.

Hybrides du bactériophage P_2 . Lorsque le bactériophage P_2 se développe dans les bactéries B, on observe l'apparition de bactériophages de type hybride. Ces bactériophages forment sur Shigella des plages dont la morphologie, ainsi qu'il sera décrit plus loin (voir page 22) diffère de celle des plages du phage P_2 sauvage. A partir de ces phages P_2 Hybride, on peut observer divers types de mutants. D'autre part, en infectant des bactéries B par des mutants différents du phage P_2 on peut obtenir des bactériophages P_2 Hybride de différents types. Les divers types de phages P_2 Hybride utilisés dans ce travail sont rassemblés dans le tableau II; pour chacun d'eux, on a indiqué leurs caractères distinctifs et leur origine. La nomenclature est celle qui a été employée dans la publication originale où ces mutants ont été décrits (Cohen (Cousin) 1959). Dans ce tableau, l'appellation P_2 Hybride est appliquée non seulement à tout bactériophage apparu lors de la multiplication du phage P_2 dans E. coli B et conférant une immunité spécifique distincte de celle qui est conférée par P_2 , mais encore à tous mutants issus de tels hybrides.

TABLEAU II

Nomenclature, origine et aspect des plages de bactériophages P₂ Hybride.

Symbole *	N° d'ordre	Origine	Morphologie des plages
P ₂ Hyldis	1	<u>HYBRIDE</u> , produit au cours de la multiplication de P ₂ vir3 dans E.coli B.	Plages troubles, contours irréguliers, de taille inférieure aux plages de P ₂ vir3.
P ₂ Hyldisvirl4	2	Produit après irradiation UV d'E.coli C(P ₂ c) (P ₂ Hyldis)	Plages claires, taille moyenne. (immunité type P ₂ Hybride).
P ₂ Hyldisvirl5	3	Mutant du n° 1	Semblable au n° 2.
P ₂ Hyldisvirl6	4	Mutant du n° 1	Semblable au n° 2.
P ₂ Hy2dis	5	<u>HYBRIDE</u> , produit au cours de la multiplication de P ₂ type sauvage dans E.coli B.	Semblable au n° 1.
P ₂ Hy2disvirl8	6	Mutant de P ₂ Hy2dis	Semblable au n° 2.
P ₂ Hy3dis	7	<u>HYBRIDE</u> , produit au cours de la multiplication de P ₂ vir1. dans E.coli B.	Semblable au n° 1.
P ₂ Hy4disrdl	8	<u>HYBRIDE</u> , produit au cours de la multiplication de P ₂ rdl. dans E.coli B.	Plages troubles à centre clair contour circulaire régulier, taille inférieure à celle de P ₂ rdl.
P ₂ Hy4disrdl (large)	9	Mutant du n° 9	semblable au n° 8, mais grande taille, égale à celle de P ₂ rdl.

* Ces symboles sont ceux qui figurent dans une publication antérieure.
Cohen 1959.

MILIEUX

Les milieux utilisés dans l'étude du bactériophage P_2 et des bactériophages qui en dérivent sont les milieux décrits par G. Bertani (1951).

Le milieu liquide est constitué comme suit (milieu LB) Bacto-tryptone 1 gr, extrait de levure 0,5 gr., $ClNa$ 1 gr., glucose 0,1 gr., eau q.s.p. 100 gr., pH ajusté à 7,0 avec de la soude 1N. Pour l'adsorption, du bactériophage P_2 , on ajoute à ce milieu du Cl_2Ca $2,5 \cdot 10^{-3} M$. La culture courante des bactéries est faite en bouillon ordinaire qui est également utilisé comme milieu de dilution.

Le milieu solide gélosé utilisé pour la numération des bactériophages est constitué de même milieu LB auquel on ajoute du Cl_2Ca (concentration $2,5 \cdot 10^{-3} M$) et 1 % de gélose. La gélose molle utilisée pour les étalements en double couche contient seulement 0,6 % de gélose. Lorsqu'on utilise des bactéries indicatrices résistantes à la streptomycine, on ajoute au milieu gélosé 10μ gr. de l'antibiotique par ml.

Les milieux utilisés dans les croisements bactériens seront décrits dans le chapitre V.

METHODES

Les méthodes d'études des bactériophages sont les méthodes classiques qui sont rassemblées dans le livre de Adams (1959). Les méthodes particulières à l'étude des bactériophages tempérés sont décrites dans la monographie de Jacob (1954).

Préparation des stocks de phages

Tous les stocks de phages P₂ Hybride ont été préparés sur Shigella ou sur coli B(X)⁻.

La plupart des stocks de phages ont été préparés en milieu liquide. Dans quelques cas, pour obtenir des lysats issus d'une plage unique, on a recouru à la méthode de préparation sur milieu solide.

Titrage des bactériophages

Les titrages ont été faits par la méthode de la double couche. Les échantillons prélevés sont mélangés avec des bactéries indicatrices dans des tubes contenant de la gélose molle à 0,6 % maintenue en surfusion dans un bain marie à 45°, puis les tubes de gélose molle sont répandus à la surface des boîtes de Pétri contenant de la gélose à 1 %.

Lorsqu'il s'agit de distinguer la morphologie des plages, l'addition de l'échantillon au tube de gélose molle est précédée d'une préadsorption en milieu liquide de 10 minutes sur bactéries indicatrices et en présence d'ions Ca. Dans un grand nombre d'expériences il sera nécessaire de distinguer les phages P₂ et les phages P₂ Hybride. Lorsque les deux types de phages se trouvent en proportions sensiblement égales, chacun des types peut être dénombré par simple examen de la morphologie des plages formées sur bactéries Sh : c'est en particulier le cas lorsque l'on a affaire à un mélange de P₂ formant des plages claires et P₂ Hybride formant des plages troubles.

Lorsque les proportions relatives des deux types de phages sont très différentes, chaque type de phage, et en particulier le type minoritaire peut être dénombré par étalement du mélange sur bactéries indicatrices spécifiques. L'étalement sur bactéries lysogènes Sh(P_2) permet de dénombrer les phages P_2 Hybride, alors que l'étalement sur bactéries lysogènes Sh(P_2 Hy) permet de dénombrer les phages P_2 . Cette méthode ne s'applique évidemment pas lorsqu'on a affaire à des bactériophages virulents qui surmontent l'immunité de la souche lysogène pour le phage homologue.

La technique des expériences à cycle unique, des expériences de production individuelle des bactériophages, de l'inactivation des bactériophages par la lumière ultraviolette, etc, sont trop bien connues pour avoir besoin d'être répétées ici. Les détails des expériences seront décrits au cours de l'exposé de celles-ci.

Il en sera de même pour les autres méthodes utilisées au cours de ce travail.

CHAPITRE II

ETUDE DE L'ORIGINE DU BACTERIOPHAGE P₂ HYBRIDE

Nous avons brièvement indiqué dans l'introduction les conditions dans lesquelles est apparu, dans un lysat de bactériophage P₂ préparé sur E. coli B, un nouveau type de phage, présentant des caractères particuliers. Il convient maintenant de revenir plus en détail sur cette expérience.

Le bactériophage P₂, comme tous les phages tempérés, forme des plages troubles lorsqu'il est étalé sur bactéries indicatrices, le trouble étant dû à la croissance des bactéries indicatrices, qui ont été lysogénisées. A partir de ce phage de type sauvage, on peut obtenir (voir pages 12 et 13) des mutants formant des plages claires. Certains de ces mutants sont des mutants virulents qui non seulement ont perdu le pouvoir de lysogéniser, mais qui ont aussi la propriété de surmonter l'immunité conférée à des bactéries lysogènes par un prophage homologue. Si des mutations de phages tempérés vers la virulence ont été observées dans de nombreux cas (Bertani 1953 a et c, Jacob et Wollman 1953, Lederberg et Lederberg 1953), la mutation réverse n'avait jamais été observée. Or, c'est en infectant des E. coli B par un bactériophage P₂ virulent issu de Shigella, que Bertani observa l'apparition, parmi les plages claires formées sur Shigella par le mutant virulent utilisé, de plages plus petites et troubles. Ce phage exceptionnel attira d'abord l'attention comme pouvant représenter une réversion du type virulent au type tempéré.

Mais une particularité plus étonnante encore du nouveau phage apparut lorsqu'ayant lysogénisé les bactéries Sh par ce phage, Bertani constata que ces bactéries lysogènes étaient sensibles au bactériophage P_2 de type sauvage, et que, réciproquement, les bactéries Sh lysogènes pour P_2 étaient sensibles à ce nouveau bactériophage.

Le bactériophage exceptionnel apparu dans le lysat des bactéries B se distinguait donc du bactériophage P_2 utilisé par deux caractères fondamentaux :

1) Il s'agissait d'un bactériophage tempéré, formant sur *Shigella* des plages troubles et d'un diamètre plus petit que celui des plages de P_2 .

2) L'immunité conférée par ce phage étant différente de l'immunité conférée par P_2 .

Ces résultats de Bertani, qui sont à l'origine du présent travail, sont résumés dans le tableau III.

Comme nous l'avons déjà indiqué dans l'introduction, le variant "dismun" obtenu par Bertani, sera dorénavant désigné par l'appellation P_2 Hybride (P_2 Hy).

PROPRIETES COMPAREES DES BACTERIOPHAGES P_2 ET P_2 HYBRIDE

Après avoir souligné les propriétés essentielles qui distinguent le bactériophage P_2 Hybride du bactériophage P_2 qui lui a donné naissance, il convient maintenant de comparer avec plus de précision les propriétés de ces deux types de phages. Dans la plupart des expériences qui

TABLEAU III

Distinction des types d'immunité conférés par les prophages P_2 et P_2 Hybride.

	Sh	Sh (P_2)	Sh (P_2 rd)	Sh (P_2 Hybride)
P_2	+	-	-	+
P_2 rd	+	-	-	+
P_2 Hybride	+	+	+	-

+ indique la sensibilité de la souche.

- indique la résistance de la souche.

vont être maintenant décrites, on a utilisé d'une part un mutant clair du bactériophage P_2 et d'autre part le bactériophage P_2 Hybride originellement isolé par Bertani. Les deux stocks de phages sont préparés sur *Shigella* et tous les étalements sont faits sur les mêmes bactéries *Sh* indicatrices. La méthode employée présente un avantage évident : on peut, en effet, opérer dans un mélange de bactériophages P_2 et P_2 Hybride et l'on peut dénombrer chaque type de phage après étalement en présence de bactéries *Sh* sur une même boîte de Pétri : les plages de P_2c sont claires et de taille moyenne alors que les plages de P_2 Hybride sont troubles et de taille plus petite.

Propriétés qui apparentent P_2 Hybride à P_2

1) Expérience à cycle unique. Le cycle de multiplication des bactériophages P_2 Hybride et P_2c a été étudié dans des expériences à cycle unique. Des bactéries *Shigella dysenteriae* ont été infectées par un mélange en proportions égales de P_2 Hybride et de P_2c , à une multiplicité de 0,1. Dans leur très grande majorité, les bactéries infectées l'ont donc été par un seul bactériophage de chaque type : soit un P_2c , soit un P_2 Hybride. Cette technique d'expérience à cycle unique, utilisant un mélange de deux types de bactériophages en quantités égales, permet de comparer, au cours d'une même expérience, le cycle de reproduction de chacun de ces types. A temps variables, des échantillons sont prélevés, puis étalés sur $ShSm^r$, et les plages formées par chacun des deux types de phage, qui se distinguent facilement par leur morphologie, sont ensuite dénombrées.

Les résultats sont illustrés par la figure 3. On voit que le temps de latence est rigoureusement égal pour

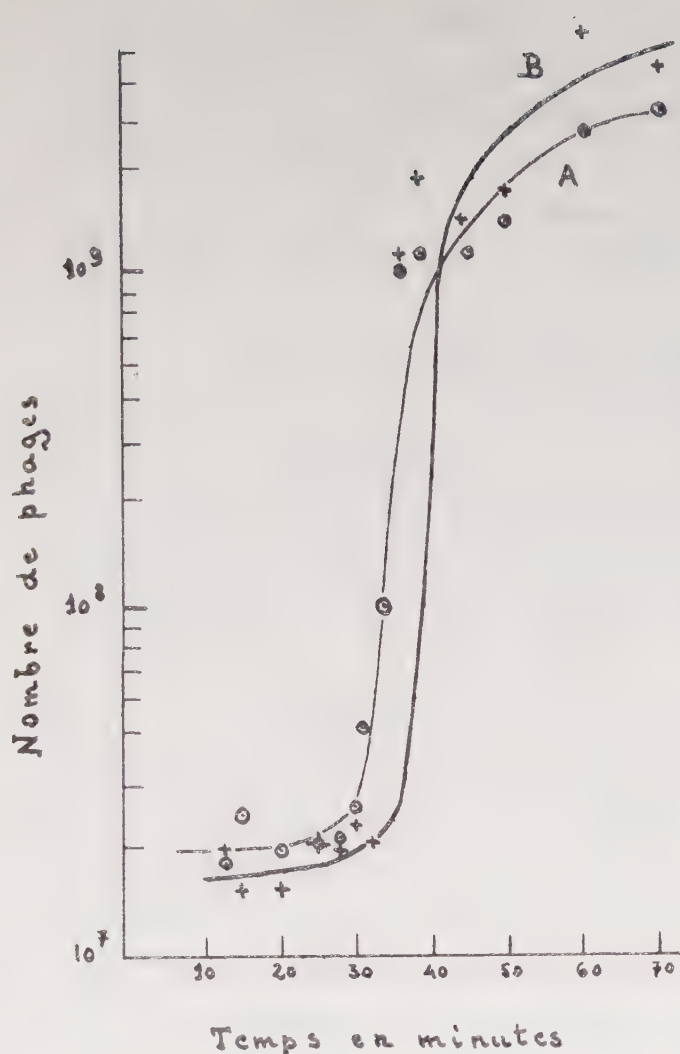


Figure 3

Cycle de multiplication des bactériophages P2 et P2 Hybride expérience à cycle unique. Des bactériophages P2 (mutant clair) et P2 Hy (n° 1 du tableau II) sont mélangés à concentrations égales. A temps 0, des bactéries Sh sont infectées par les bactériophages de ce mélange à une multiplicité d'infection de 0,2. Après adsorption, le mélange est dilué (10^{-4} : tube I, 10^{-6} : tube II) et à temps variables des échantillons sont prélevés et étalés sur bactéries indicatrices Sh. En abscisse : le temps en minutes. En ordonnée : le nombre de phages, par ml du tube I. La courbe A représente le cycle de multiplication de P2, la courbe B celui de P2 Hy.

les deux types de phage : soit trente minutes. Le rendement moyen de P_2c a été, dans cette expérience, de l'ordre de 100 et celui de P_2 Hybride a été légèrement supérieur. Ces valeurs concordent avec celles précédemment obtenues pour P_2 , dont le temps de latence publié par Bertani (1958) est de trente minutes et le rendement moyen de cent.

2) Sensibilité au sérum anti- P_2 . Parmi les critères permettant de caractériser un bactériophage, la spécificité antigénétique est un critère particulièrement important. (Burnet et col. 1937) (Delbrück 1946). En effet, différents mutants d'un même phage conservent la même sensibilité vis-à-vis d'un anti-sérum préparé contre l'un d'eux.

Un mélange de bactériophages P_2c et P_2 Hybride à parties égales est mis en contact avec un sérum anti- P_2 . Les taux d'inactivation de chacun des deux types de phage sont tout à fait comparables. Ce type d'expérience a d'ailleurs été répété en utilisant différentes combinaisons de bactériophages P_2 et P_2 Hybride. Dans tous les cas, les courbes d'inactivation obtenues sont pratiquement identiques, comme on peut le voir sur la figure 4.

3) Sensibilité à la lumière ultra-violette . Des bactériophages appartenant à des types différents présentent en général une sensibilité différente au rayonnement ultra-violet. Par contre, différents mutants d'un même bactériophage présentent le plus souvent la même sensibilité à ce rayonnement. Ce critère cependant, a un caractère moins absolu que celui fourni par la spécificité sérologique.

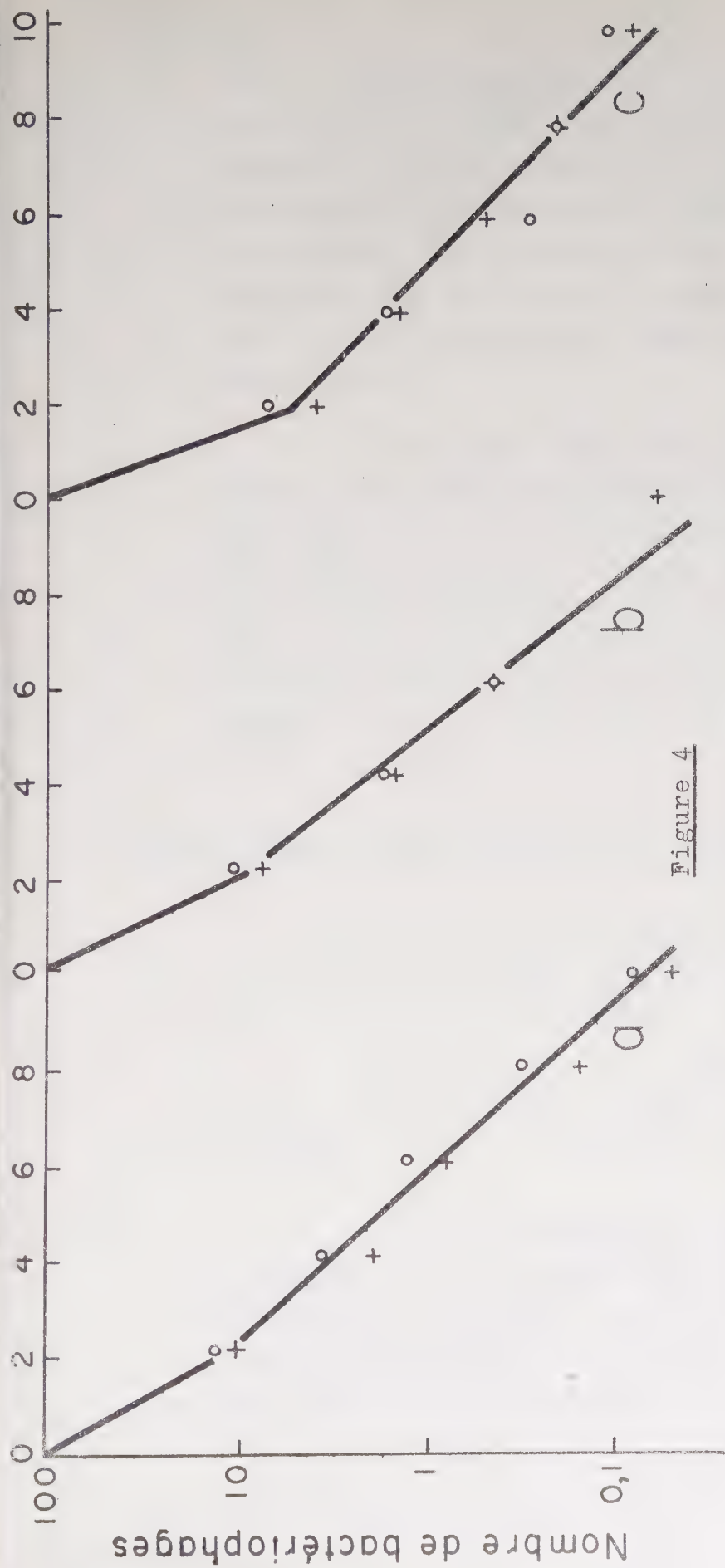


Figure 4

Inactivation des bactériophages P2 et P2 Hybride par un serum anti-P2. Des phages sont mélangés deux par deux et soumis ensemble à l'action d'un serum anti-P2. Les mélanges sont composés de telle sorte que les plages de chaque type de phage soient reconnaissables : un phage clair ou virulent et un phage tempéré. Les groupes sont constitués de la manière suivante : courbe a, P2 mutant clair - P2 Hy n° 1 tableau II, courbe b, P2 vir 3 P2 Hy n° 9 tableau II. Pour ces deux courbes les points représentent les P2 et les croix, les hybrides. Les lysats de tous ces phages ont été obtenus par lyse des bactéries Sh. Mais la courbe b représente l'inactivation de deux hybrides différents (points : n° 1, croix n° 3, du tableau II le n° 1 ayant été obtenu par lyse de bactéries BX⁻). En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, le nombre de phages survivants (en %).

Un mélange de P_2c et de P_2 Hybride est soumis à des doses croissantes de lumière ultra-violette et les courbes de survie de ces deux types de bactériophages sont déterminées par étalement à temps variables sur *Shigella dysenteriae*. Les résultats d'une telle expérience sont rapportés sur la figure 5, où l'on peut voir que les courbes d'inactivation de ces deux bactériophages sont très comparables.

Les expériences qui viennent d'être rapportées montrent que les deux types de bactériophages étudiés présentent des propriétés communes. Ils ont en effet le même temps de latence, le même rendement moyen, et leurs sensibilités au sérum anti- P_2 et à la lumière ultra-violette sont pratiquement identiques. L'ensemble de ces résultats indique donc qu'il existe une incontestable parenté entre les deux types de bactériophages.

Propriétés qui distinguent P_2 et P_2 Hybride

Après avoir considéré les propriétés qui rapprochent les bactériophages P_2 et P_2 Hybride, nous allons à présent étudier les propriétés qui les distinguent.

Ainsi qu'il a été précédemment exposé, le premier P_2 Hybride isolé est apparu dans un lysat de P_2 virulent.

1) Contrairement au bactériophage dont il est issu, P_2 Hybride est un bactériophage tempéré. Il est capable de lysogéniser différents types de bactéries qui sont sensibles au bactériophage P_2 . Il confère à ces bactéries une immunité spécifique. Le bactériophage P_2 vir3 est, lui un mutant

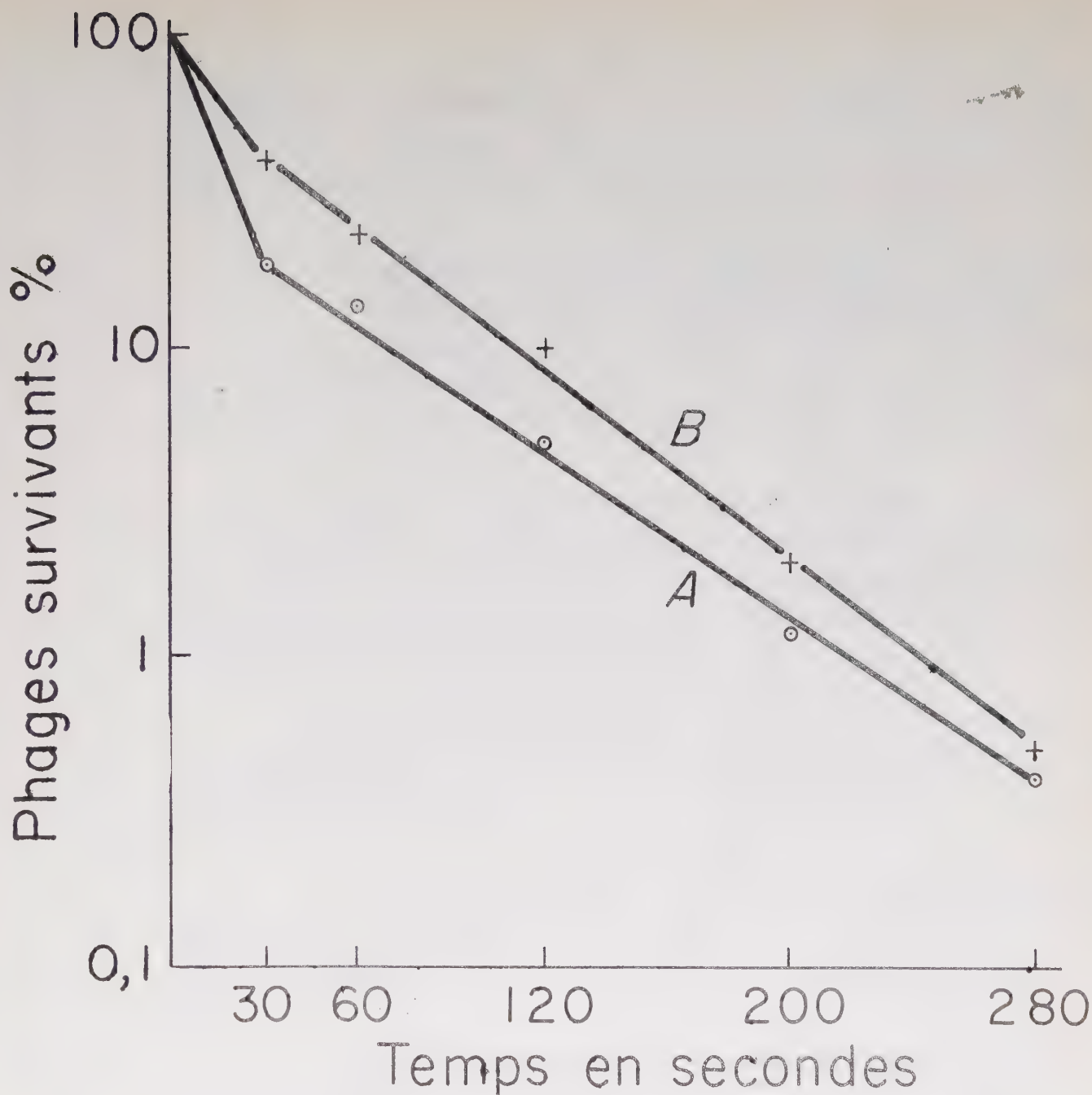


Figure 5

Inactivation des bactériophages P2 et P2 Hybride par la lumière ultra-violette. Des bactériophages P2c et P2 Hyldis sont mélangés et le mélange est dilué dans une solution tampon, puis irradié. Des prélèvements sont effectués à temps variables, et une dilution convenable est pré-adsorbée sur ShSm^r pendant 9', puis étalé sur boîte de Pétri. Les deux types de phages peuvent être aisément distingués par l'aspect de leurs plages. En abscisse : durée d'exposition à la lumière ultre-violette en secondes. En ordonnée : Nombre de phages survivants (en %). Courbe A : inactivation des phages P2. Courbe B : inactivation des phages P2 Hybride.

virulent du bactériophage P_2 qui, non seulement n'est pas capable de lysogéniser, mais qui est actif sur les bactéries lysogènes pour un P_2 de type sauvage.

2) L'immunité conférée par P_2 Hybride est d'un type distinct de celle conférée par tout P_2 tempéré. Il n'y a pas d'immunité croisée entre P_2 et P_2 Hybride alors que P_2 et ses divers mutants non virulents ont le même spectre d'immunité. (voir tableau III).

3) Les plages fournies par P_2 Hybride sur Shigella sont troubles et de petite taille, alors que les plages de P_2 vir³ sont claires et de plus grande taille. C'est ainsi, d'ailleurs, que la présence de ce nouveau type de bactériophage a été tout d'abord remarquée.

Notons dès maintenant que l'aspect des plages de P_2 Hybride diffère aussi de celui des plages de P_2 type sauvage (voir figure 6).

4) Enfin P_2 Hybride présente une sensibilité à la température plus élevée que celle de P_2 vir³ (figure 7). (La première observation concernant cette propriété a été faite par E. Six).

L'étude comparée des propriétés des bactériophages P_2 Hybride et du bactériophage P_2 dont il est issu indique donc que si ces deux types de bactériophages présentent une parenté indéniable, ils diffèrent cependant par trop de caractères pour que la phage P_2 Hybride puisse être considéré comme un simple variant du bactériophage P_2 . Le fait, en particulier, que l'immunité conférée par le bactériophage P_2 Hybride soit différente de l'immunité

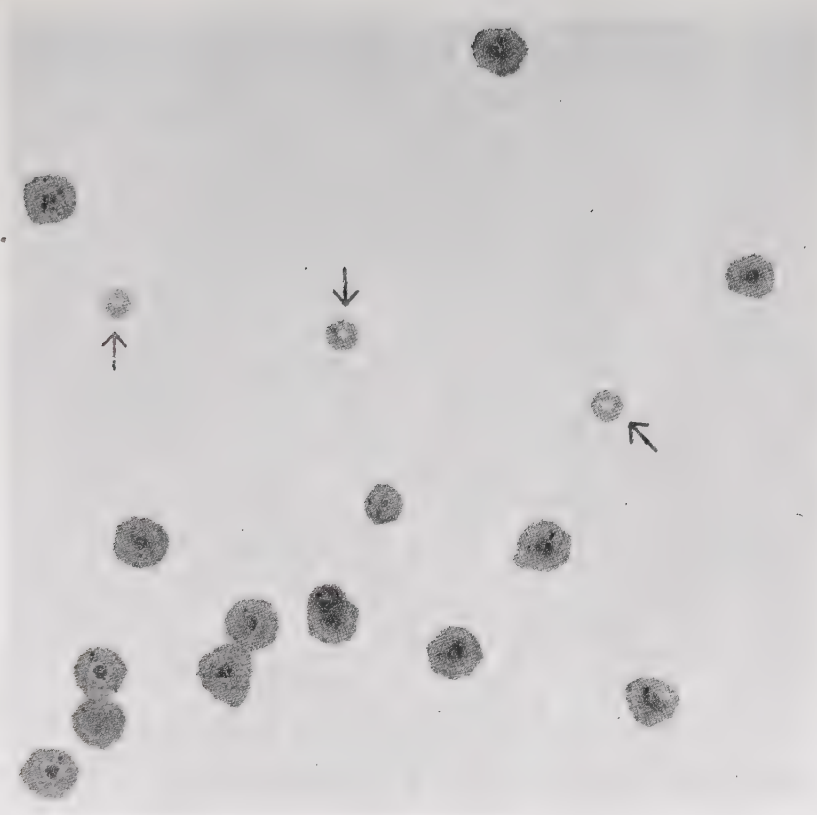


Figure 6

Plages du bactériophage P2 Hybride (indiquées par les flèches) dans un mélange de bactériophages P2 type sauvage et P2 Hy2dis.

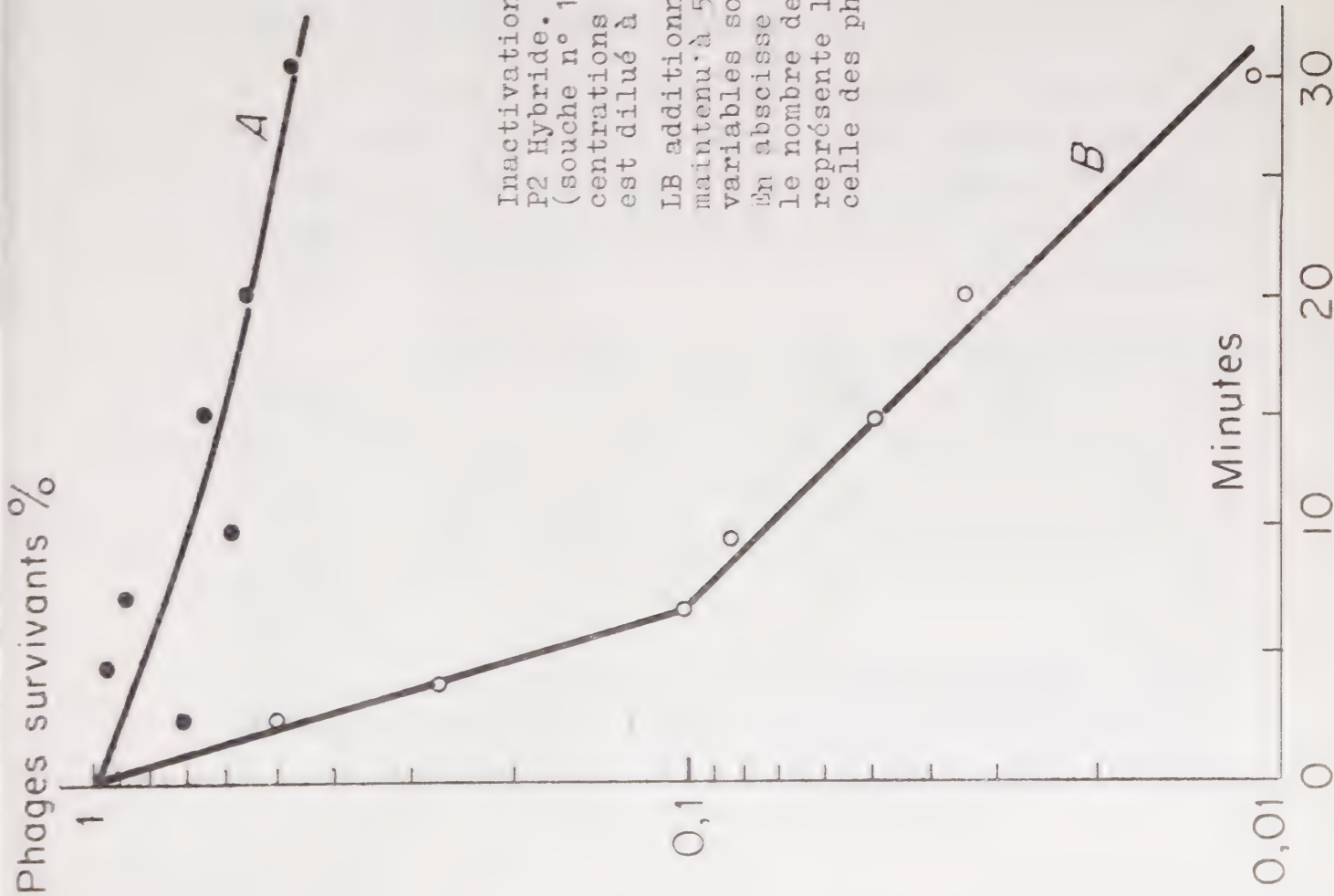


Figure 7

Inactivation thermique des bactériophages P2 et P2 Hybride. Des bactériophages P2 et P2 Hybride (souche n° 1 du tableau II) sont mélangés à concentrations égales, et un échantillon du mélange est dilué à temps zéro dans du bouillon (milieu LB additionné de NaCl à 1 % et de $MgSO_4$ $M 10^{-4}$) maintenu à 53°. Des échantillons, prélevés à temps variables sont étalés sur bactéries indicatrices. En abscisse : le temps en minutes. En ordonnée : le nombre de phages survivants (en %). La courbe A représente la survie des phages P2, la courbe B, celle des phages P2 Hybride.

conférée par P_2 conduisait à analyser avec plus de précision l'origine du phage P_2 Hybride.

ORIGINE DE P_2 HYBRIDE

Il convient de noter tout d'abord que si le phage P_2 Hybride est apparu pour la première fois dans un lysat de phages P_2 vir3 préparé sur E. Coli B, il ne s'agit pas là d'un événement fortuit. Chaque fois que les bactéries B sont infectées par du phage P_2 vir3, préparé sur Shigella, et que les phages produits sont étalés sur Shigella, on retrouve des phages P_2 Hybride dans une proportion de 10^{-3} à 10^{-4} . Aucun bactériophage de type P_2 Hybride n'apparaît jamais dans les stocks de bactériophage P_2 préparés sur Shigella.

Fait remarquable, si les phages de type P_2 issus de B forment des plages aussi bien sur Shigella que sur E. Coli B, au contraire, les phages P_2 Hybride forment des plages sur Shigella mais non sur E. Coli B. La souche E. Coli B apparaît donc résistante au phage P_2 Hybride.

Soit un stock de phage P_2 , préparé sur Shigella. Comme il a été indiqué dans le chapitre I (page 10) un tel stock forme environ 10^{-5} fois moins de plages sur E. Coli B que sur Shigella. Dans les mêmes conditions, un stock de phages P_2 Hybride ne forme aucune place sur E. Coli B, même lorsque l'on étale sur cette bactérie 10^9 phages.

Le bactériophage P_2 Hybride n'apparaît donc que lors de la multiplication du phage P_2 dans les bactéries B, mais sa présence ne peut être révélée que par étalement

sur *Shigella*, car il est incapable de former des plages sur *E. coli* B.

Ces observations, jointes au fait que le bactériophage P_2 Hybride s'adsorbe sur les bactéries B, conduisent à émettre l'hypothèse que la résistance manifestée par les bactéries B envers le bactériophage P_2 Hybride serait le fait d'une immunité spécifique. Les bactéries B seraient porteuses d'un prophage inconnu, le prophage X, qui leur confère cette immunité spécifique. Lors de l'infection des bactéries B par le bactériophage P_2 , il se produirait une recombinaison génétique entre le bactériophage P_2 et le prophage X, ce qui expliquerait l'apparition d'un type recombinant, le phage P_2 Hybride, possédant certaines propriétés du phage P_2 , et le type d'immunité conférée par le prophage X (Cohen (Cousin) 1959). Cette hypothèse rendrait compte de tous les faits exposés jusqu'ici.

Obtention du bactériophage P_2 Hybride à partir de différents mutants du bactériophage P_2

Si cette hypothèse est correcte, on doit s'attendre à obtenir des phages de type P_2 Hybride lorsqu'on infecte des bactéries B par un quelconque mutant du bactériophage P_2 .

Des stocks des différents mutants du phage P_2 sont étalés sur bactéries B. Les plages des phages P_2 obtenues sont prélevées et mise en suspension en bouillon. Les bactériophages contenus dans ces divers échantillons sont alors étalés sur bactéries indicatrices.

L'étalement peut être fait sur bactéries ShSm^r qui révèlent tous les types de phages produits. Les bactériophages de type P_2 Hybride peuvent être reconnus par la dimension et l'aspect de leurs plages qui sont plus petites et plus troubles que celles d'un bactériophage P_2 , même de type sauvage (figure 6). Si le bactériophage P_2 utilisé est tempéré ou de type clair, il est plus commode de pratiquer l'étalement sur des bactéries $\text{Sh}(P_2)\text{Sm}^r$. Sur ces bactéries indicatrices, seuls les bactériophages de type P_2 Hybride forment des plages. Leur proportion dans le mélange peut être estimée en comparant le nombre des plages produites sur $\text{Sh}(P_2)\text{Sm}^r$ et sur bactéries ShSm^r . L'utilisation de bactéries indicatrices résistantes à la streptomycine permet d'éliminer les bactéries B survivantes.

Des expériences de ce type, réalisées sur toute une série de phages P_2 , ont montré que dans tous les cas, l'infection des bactéries B aboutit à la formation de phages P_2 Hybride.

Il convient de noter que les phages P_2 Hybride isolés sont toujours des phages tempérés, formant des plages troubles, même lorsque les bactériophages P_2 utilisés sont eux mêmes clairs ou virulents. Chaque type de P_2 Hybride isolé est cependant capable de donner par mutation des types clairs ou virulents. L'interprétation génétique de ces faits sera examinée ultérieurement. Quelques types de P_2 Hybride sont rassemblés dans le tableau II où l'on trouvera les indications concernant leurs caractères et leur origine.

Les différents isolements de phages P_2 Hybride ont été réalisés en utilisant comme critère soit l'aspect des plages formées, soit la capacité des phages de former

des plages sur bactéries $Sh(P_2)Sm^r$. Il convenait de vérifier que ces différentes souches de phages P_2 Hybride possèdent bien les propriétés caractéristiques du phage P_2 Hybride original, qui ont été décrites au début de ce chapitre.

Tous ces phages possèdent des propriétés qui les apparentent au bactériophage P_2 et en particulier la même spécificité sérologique que ce phage. Dans une série d'expériences, des bactériophages P_2 Hybride ont été mélangés en proportions égales avec un bactériophage P_2 , et le mélange soumis à l'action d'un immun serum anti- P_2 . Les résultats de telles expériences sont illustrés par la figure 4. On voit que dans chaque cas, les courbes d'inactivation du phage P_2 Hybride et du phage P_2 coïncident pratiquement et que les courbes d'inactivation sont très comparables d'une expérience à l'autre. On peut donc conclure que tous les phages P_2 Hybride étudiés ont la même sensibilité à un immun serum anti- P_2 que le bactériophage P_2 lui-même.

Ainsi, quelque soit le type de mutant du phage P_2 utilisé, on peut, après infection des bactéries B par un tel phage, isoler un bactériophage de type P_2 Hybride. Les divers bactériophages P_2 Hybride ainsi isolés, même s'ils diffèrent les uns des autres par certains caractères tels que l'aspect de leurs plages, possèdent tous la propriété de former des plages sur des bactéries immunes envers le bactériophage P_2 . Ils conservent cependant la même spécificité sérologique que le bactériophage P_2 qui leur a donné naissance.

Obtention de phages P₂ Hybride à partir de différentes souches d'E. coli B

Divers mutants du phage P₂ donnent donc naissance, après multiplication sur des bactéries de la souche B d'E. coli, à des phages P₂ Hybride. Toutes les souches d'E. coli B que nous avons examinées sont immunes au phage P₂ Hybride et produisent des phages P₂ Hybride lorsqu'elles sont infectées par un bactériophage P₂. (*) Ces souches, quoiqu'ayant la même origine (Delbrück et Luria 1942) ont été entretenues dans différents laboratoires depuis un grand nombre d'années. D'autres souches d'E. coli B, qui diffèrent du type sauvage par une variété de caractères (tableau I) ont été également examinées. Ces différentes souches possèdent toutes le prophage X (voir également page 37 et suivantes).

ANALYSE QUANTITATIVE DE L'APPARITION DU PHAGE P₂ HYBRIDE

La formation de phages P₂ Hybride étant un phénomène constant qui ne dépend ni du type particulier de phage P₂, ni de la souche particulière d'E. coli B utilisés, il convient maintenant d'analyser ce phénomène d'une manière quantitative.

(*) Ont été examinées en particulier les souches d'E. coli B utilisées au California Institute of Technology (Pasadena), au virus laboratory (Berkeley), dans le service de physiologie microbienne de l'Institut Pasteur, etc...

Cinétique d'apparition du phage P₂ Hybride

Des bactéries B sont infectées par des bactériophages P₂ et les proportions relatives des bactériophages P₂ et P₂ Hybride, produits au cours de l'infection, sont déterminées dans une expérience à cycle unique. L'évolution du nombre des phages P₂ est déterminée par étalement à temps variable sur des bactéries Sm^r. Les phages de type P₂ Hybride qui apparaissent dans des proportions beaucoup plus faibles que les phages de type P₂ sont dénombrés par étalement sélectif sur Sh(P₂) Sm^r.

Les résultats de deux expériences de ce type sont rapportés sur la figure 8, où l'on voit que l'évolution du nombre des deux types de phage progresse sensiblement de la même manière, la proportion relative des P₂ Hybride par rapport aux P₂ demeurant constante pendant tout le cours du cycle de multiplication. Dans les deux expériences rapportées sur la figure 8, cette proportion est respectivement de $2,5 \cdot 10^{-4}$ et de 10^{-3} . Ces expériences ont été prolongées assez longtemps pour qu'il soit possible d'affirmer que la production des phages P₂ Hybride est concomittante à celle des phages P₂, et que la majorité de ces phages de type nouveau n'est pas libérée au cours de lyses tardives.

Etude de la production des phages P₂ Hybride par des bactéries individuelles

Les expériences à cycle unique ayant montré que les bactériophages P₂ Hybride étaient produits dans des proportions voisines de 10^{-3} par rapport aux phages P₂,

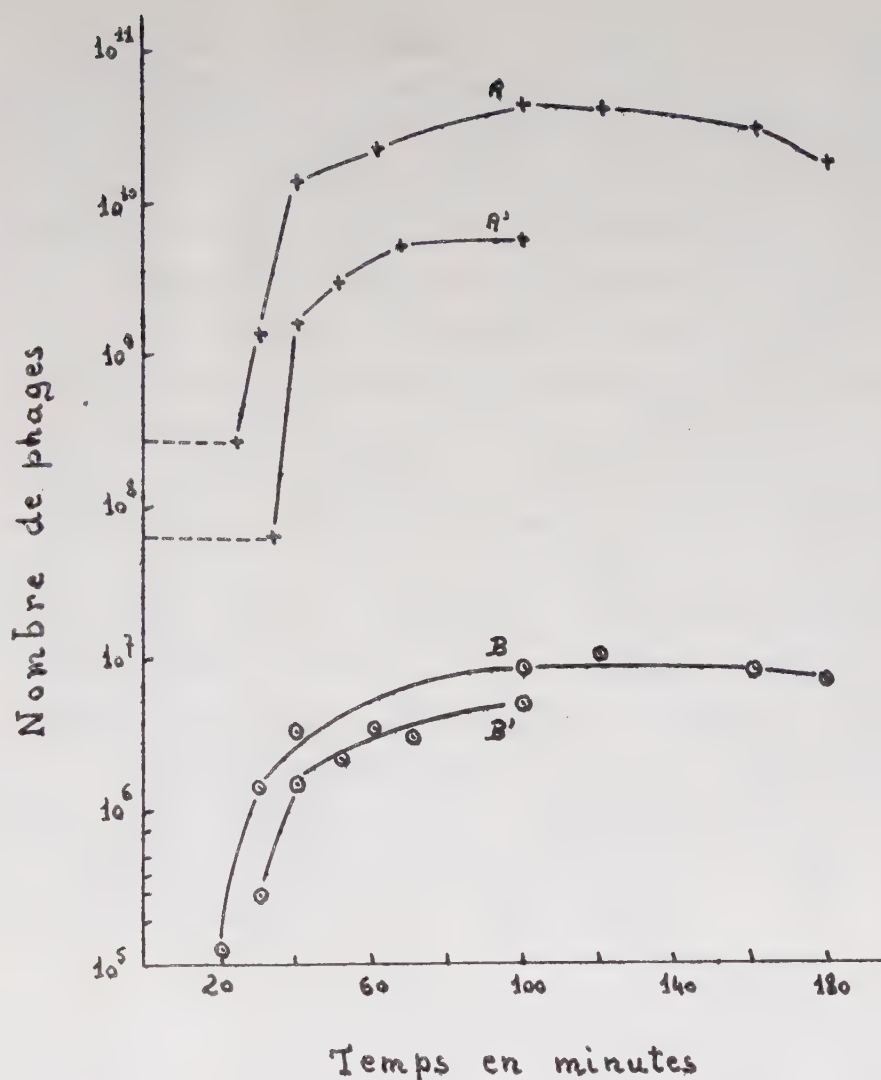


Figure 8

Cinétique d'apparition des phages P2 Hybride au cours de l'infection d'E. coli B par des bactériophages P2. A temps zéro, des bactéries B sont infectées par des bactériophages P2. A temps variables, des échantillons sont prélevés et étalés sur bactéries indicatrices (ShSm^r pour les phages P2 et ShSm^r (P2) pour les P2 Hybride). En abscisse : le temps en minutes. En ordonnée : le nombre de phages. La courbe A correspond à un P2 virulent (P2 vir1) et la courbe B à l'hybride formé au cours de sa multiplication chez la bactérie B. Les courbes A' et B' correspondent au phage P2 type sauvage et à l'hybride formé au cours de sa multiplication dans E. coli B.

la production de ces bactériophages a été étudiée dans des expériences de production individuelle. Les conditions expérimentales ont été ajustées en conséquence, les bactéries infectées par le phage P_2 étant distribuées à raison d'environ quinze bactéries par tube. Après incubation à 37° pendant 70 minutes, le contenu de chaque tube est étalé sur bactéries indicatrices $Sh(P_2)Sm^r$ afin de ne dénombrer que les phages P_2 Hybride. Le résultat d'une telle expérience est rapporté sur le tableau IV. On voit que la distribution du nombre de phages P_2 Hybride produits correspond assez précisément à une distribution de Poisson : la plupart des tubes qui contiennent du P_2 Hybride, n'en contiennent qu'une particule. Dans une bactérie productrice donnée, la formation de phage P_2 Hybride est donc un événement rare. Le fait que les bactéries qui libèrent du P_2 Hybride en libèrent très peu indique que la formation du P_2 Hybride est un événement tardif dont la probabilité est d'autant plus grande que le nombre de phages P_2 intra-bactériens est plus élevé.

Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle la production des bactériophages P_2 Hybride serait la conséquence de rares recombinaisons génétiques avec un élément présent dans les bactéries B.

Fait important, étant donné que chaque lyse productive ne produit en général qu'une seule particule de P_2 Hybride, on peut conclure que dans tout lysat du bactériophage P_2 obtenu sur la souche B, chaque hybride observé provient d'un événement d'hybridation indépendant.

o

o

o

TABLEAU IV

Rendement individuel en phages P_2 Hybride de bactéries E.coli B
infectées par un phage P_2

	Observé	Calculé
Nombre total de tubes	50	
Nombre de tubes contenant P_2 Hybride	21	
Nombre de phages P_2 Hybride par tube :	Nombre de tubes contenant le nombre de phages P_2 Hy indiqué (a)	
0	29	
1	12	16
2	6	3,2
3	2	0,58
4	1	0,08
Nombre total de bactéries infectées par P_2 dans l'ensemble des tubes (b)	800	
Nombre total des bactéries produisant P_2 Hy dans l'ensemble des tubes (b)	25	27,5

Des bactéries E.coli $B(X)^+$ ont été infectées par un phage P_2 préparé sur des bactéries $B(X)^-$ à raison d'environ 2 phages par bactérie. La suspension a été diluée, des échantillons de 0,5 ml ont été distribués dans 50 tubes à raison d'environ 15 bactéries infectées par tube (b). Des échantillons de cette suspension sont également titrés, d'une part sur $ShSm^r$ pour dénombrer les bactéries infectées par P_2 , et d'autre part sur $ShSm^r$ (P_2) pour déterminer le nombre de bactéries produisant du P_2 Hybride. La streptomycine a été vaporisée sur les boîtes après 3 heures d'incubation à 37° . Après 70 minutes environ de séjour à 37° , le contenu de chaque tube a été étalé sur des bactéries $Sh (P_2)Sm^r$ de manière à ne dénombrer que les phages P_2 Hy.

a) calculé d'après le nombre de tubes ne contenant pas de P_2 Hybride, selon la distribution de Poisson.

Au cours de ce chapitre, nous avons entrepris l'étude d'un phage tempéré dont l'originalité est de conférer à la bactérie qu'il lysogénise une immunité différente de celle du phage P_2 dont il est incontestablement issu. Ce phage apparaît régulièrement au cours de la multiplication du phage P_2 dans la souche *Escherichia coli* B, elle-même résistante au phage étudié. On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle la résistance de la souche B serait une immunité, conférée par un prophage X, avec lequel P_2 se recombinerait au cours de son développement dans *E. coli* B. Un hybride prendrait naissance, qui aurait hérité de la région immunitaire de X. La vérification de cette hypothèse est l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR LA NATURE DU PROPHAGE X D'E. COLI B

L'étude comparée de la multiplication du bactériophage P_2 dans les bactéries Shigella d'une part et dans les bactéries E. coli B d'autre part a mis en évidence deux faits importants : le bactériophage P_2 Hybride n'apparaît que lors de la multiplication du phage P_2 dans E. coli B, et les bactéries E. coli B, quoiqu'étant réceptrices, ne permettent pas la reproduction du phage P_2 Hybride. L'hypothèse selon laquelle les bactéries B seraient porteuses d'un prophage X rend compte de ces faits. Le but du présent chapitre est de démontrer la présence d'un tel prophage et d'étudier sa nature. On verra que les résultats obtenus indiquent qu'il s'agit d'un prophage défectif.

ISOLEMENT DE SOUCHES D'E. COLI B DEPOURVUES DU PROPHAGE X

Le caractère lysogène d'une souche est un caractère relativement stable. Il advient cependant qu'une bactérie lysogène perde son prophage ; mais l'isolement de tels individus "guéris" de leur prophage est souvent malaisé. Dans une population de bactéries lysogènes, la proportion d'individus "guéris" est en effet très faible, et les individus ayant perdu leur immunité sont éliminés par le bactériophage présent dans le milieu de culture. Différentes méthodes ont cependant été décrites qui permettent de sélectionner les bactéries guéries, ou même

d'accroître la proportion de bactéries guéries présentes dans une culture de bactéries lysogènes. C'est ainsi que den Dooren de Jong (1931), en isolant des variants asporogènes (ou mutilats) d'un *B. megaterium* lysogène, constata que les variants asporogènes n'étaient pas lysogènes. Des souches non lysogènes du même *B. megaterium* ont été obtenues par passages successifs dans un milieu synthétique contenant du citrate (Clarke 1952). Des passages répétés dans un milieu synthétique dépourvu d'ions fixateurs de calcium ont également permis d'isoler des variants non lysogènes de ce même *B. megaterium* (Lwoff 1953).

Il est cependant possible de déceler la présence de bactéries non lysogènes dans une population de bactéries lysogènes. C'est ainsi que Stolp (1957) a étudié la perte spontanée du prophage de *B. megaterium*. Des échantillons d'une culture lysogène sont étalés à la surface de boîtes de Pétri. Après séjour à l'étuve, les colonies en voie de développement sont soumises à l'action d'une suspension concentrée du phage homologue, puis replacées à l'étuve. Les colonies de bactéries sensibles qui sont partiellement lysées, peuvent ainsi être distinguées des colonies de bactéries lysogènes. Dans le cas de *B. megaterium*, Stolp a pu ainsi établir que la proportion de bactéries non lysogènes étaient de l'ordre de 10^{-4} . Bertani (1958) a appliqué cette méthode à l'étude de la perte spontanée du prophage P_2 . Il a trouvé que dans une population de bactéries $Sh(P_2)$ il existait de l'ordre de 10^{-3} bactéries non lysogènes et sensibles au phage P_2 .

Certaines méthodes permettent d'accroître la fréquence des bactéries non lysogènes et en facilitent

ainsi l'isolement. C'est ainsi que l'irradiation par la lumière ultra-violette accroît la fréquence de la guérison des bactéries lysogènes (Lederberg et Lederberg 1953). La surinfection de bactéries lysogènes par un mutant virulent du phage homologue permet également d'obtenir des dérivés non lysogènes d'une souche lysogène, les premières expériences de ce type ayant été réalisées avec des bactéries lysogènes pour le phage P_2 (Bertani 1953 d). Enfin, dans certains cas, on obtient des souches guéries d'un prophage donné en infectant les bactéries lysogènes par un phage tempéré hétérologue ou par un mutant d'un tel phage (Jacob et Wollman 1957).

Si, comme nous l'avons supposé, la souche B d'E. coli perpétue une unité douée de continuité génétique, le prophage X, il devrait être possible d'isoler des variants de cette souche qui seraient dépourvus du prophage. De tels variants "guéris" ne devraient plus être immuns envers le phage P_2 Hybride et, infectés par le bactériophage P_2 , ne devraient pas donner naissance à des phages P_2 Hybride.

Isolement de souches $B(X)^-$ après action de la lumière ultra-violette

Le premier moyen utilisé pour obtenir la guérison de la souche B a été l'action de la lumière ultra-violette.

Une culture d'E. coli B, en phase exponentielle, a été centrifugée ; les bactéries ont été remises en suspension en tampon puis soumises à l'action de la lumière ultra-violette de manière à obtenir une survie d'environ

10^{-3} . Les bactéries survivantes ont été étalées sur boîtes de Pétri et placées à 37° . Lorsque les colonies commencent à être visibles, un lysat d'un mutant clair du bactériophage P_2 Hybride a été vaporisé sur la surface de chaque boîte (*). Après séjour à l'étuve, les boîtes vaporisées ont été examinées pour déceler la présence de colonies partiellement lysées selon la technique de Stolp. Parmi dix mille colonies examinées, quinze présentaient des secteurs de lyse, alors qu'aucune colonie semblable n'a été observée parmi quatre mille colonies d'E. coli B non irradié, traité de la même façon. C'est à partir de quatre colonies sensibles à P_2 Hybride que des lignées pures d'E. coli B guéri ont été isolées (Cohen (Cousin) 1959).

Isolement de souches $B(X)^-$ après infection d'E. coli B par des phages P_2

L'infection d'E. coli B par un phage P_2 virulent permet également d'isoler des bactéries B guéries de leur prophage. C'est ainsi que parmi 110 colonies de bactéries B ayant résisté à l'infection par un phage P_2 vir6 (page 13), une colonie s'est révélée être sensible au phage P_2 Hybride.

(*) Le phage utilisé a été le mutant P_2 Hydisvir14 (tableau 2) dont un stock de titre élevé ($4 \cdot 10^{10}$ par ml) a été préparé sur bactéries Sh. Ainsi qu'il a été indiqué (page 10) des phages P_2 préparés sur bactéries Sh ne sont actifs sur E. coli B qu'avec une efficacité de l'ordre de 10^{-5} . Il convient donc d'utiliser un stock de phages de titre élevé.

Si l'infection de bactéries lysogènes par un phage homologue, lui-même incapable de lysogéniser, permet d'isoler des bactéries non lysogènes, on observe également que l'infection par un mutant tempéré du phage homologue a souvent pour conséquence la perte du prophage (Bertani 1953 a). Deux types de résultats peuvent, à cet égard être observés. D'une part, on peut isoler des souches non lysogènes ; d'autre part, on peut isoler des souches qui sont lysogènes pour le type de phage ayant servi à l'infection mais qui ont perdu le prophage initial. Dans ce cas, il s'agit d'une guérison par substitution de prophages.

Des résultats semblables ont été obtenus lorsque la souche B d'E. coli est infectée par un bactériophage P_2 tempéré. Dans une expérience de ce type, 2 % des colonies isolées étaient constituées de bactéries $B(X)^-$ guéries qui ne sont lysogènes ni pour X, ni pour P_2 , et 1 % des colonies de bactéries lysogènes pour P_2 . 20 colonies de bactéries $B(P_2)$ ont été examinées : toutes étaient constituées de bactéries sensibles à P_2 Hybride. Dans ce cas, on a donc affaire à une substitution de prophages. De telles souches lysogènes pour P_2 peuvent être à leur tour guéries par un phage P_2 virulent. On obtient ainsi des bactéries qui sont sensibles à la fois au phage P_2 et au phage P_2 Hybride. Notons que la fréquence de la guérison de telles bactéries $B(P_2)$ par un mutant virulent de P_2 est beaucoup plus grande que la fréquence de la guérison de bactéries $B(X)^+$ par le même phage (près de 14 % au lieu de moins de 1 % dans ce dernier cas).

COMPARAISON DES PROPRIETES DES SOUCHES $B(X)^+$ ET $B(X)^-$

Le critère utilisé pour l'isolement de souches qui sont présumées avoir perdu le prophage X a été la sensibilité au phage P_2 Hybride. Il convenait de vérifier que ces souches ont également perdu la propriété qui avait conduit à émettre l'hypothèse du prophage X, c'est-à-dire le pouvoir de donner naissance à des phages de type P_2 Hybride après infection par le bactériophage P_2 . C'est ce qui a été vérifié dans chaque cas : les souches $B(X)^-$, infectées par le bactériophage P_2 , ne donnent jamais naissance à des bactériophages de type P_2 Hybride. Elles ont donc bien les propriétés attendues de souches non lysogènes $B(X)^-$ (tableau V).

La lysogénie, si elle se définit par la perpétuation du matériel génétique d'un prophage et par une immunité spécifique, peut également se manifester par d'autres propriétés. La présence d'un prophage peut en effet conférer aux bactéries qui le perpétuent certains caractères qui les distinguent des bactéries non lysogènes homologues. C'est ainsi que les bactéries lysogènes pour un prophage inducible présentent une plus grande sensibilité à la lumière ultra-violette que les bactéries non lysogènes homologues (Lwoff, Siminovitch et Kjelgaard 1950).

Une comparaison a donc été faite entre les souches $B(X)^+$ et $B(X)^-$ pour certaines de leurs propriétés. Notons tout de suite qu'aucune différence n'a été jusqu'ici décelée entre les deux types de souches. Elles ont la même sensibilité aux bactériophages de la série T, la même

TABLEAU V

Propriétés comparées des souches B et B guérie.

	B(X) ⁺	B(X) ⁻	B(P2)
Sensibilité à P ₂	+	+	-
Sensibilité à P ₂ Hybride	-	+	+
Production de P ₂ Hybride comme conséquence de l'in- fection par P ₂ .	+	-	-

sensibilité à la lumière ultra-violette.

Un phénomène intéressant, qui est caractéristique de la souche B d'E. coli est la variation conditionnée par l'hôte, ou variation phénotypique, que l'on observe lorsqu'on infecte des bactéries B par un bactériophage P_2 préparé sur bactérie Sh. Ce phénomène a été décrit au début de ce mémoire (page 10). Or, on sait que de tels phénomènes sont fréquemment sous la dépendance de prophages. C'est ainsi que le bactériophage P_2 forme 10^6 fois moins de plages sur bactéries Sh(P_1) que sur bactéries Sh (Bertani 1953 d - Lederberg 1957).

Les bactériophages P_2 issus de bactéries Sh(P_1) ont, eux, la même efficacité d'étalement sur bactéries Sh(P_1) que sur bactéries Sh (Christensen 1961). On voit donc que dans ce cas la présence d'un prophage interfère avec la multiplication d'un autre bactériophage et est également responsable de la modification spécifique de ce bactériophage.

Telle n'est pas cependant l'interprétation qu'il convient de donner aux phénomènes d'interférences et de variation conditionnée par l'hôte que l'on observe dans le cas du phage P_2 et des bactéries $B(X)^+$. En effet, ce dernier phénomène s'observe également lorsqu'on infecte par le bactériophage P_2 des bactéries $B(X)^-$ guéries.

La souche B d'E. coli ayant fait l'objet de nombreuses études, certains phénomènes ont été observés chez ces bactéries - ou chez des variants de la souche B (tableau I) - dont on pouvait se demander s'ils n'étaient pas liés à la présence du prophage X.

C'est ainsi que certains mutants du phage T_4 (groupe rII et III de Benzer) forment des plages claires sur la souche B usuelle contrairement au type $T_4 r^+$ sauvage qui forme des plages d'un diamètre plus petit entourées d'un halo trouble. Mais étalés sur une souche variante de B (B Berkeley) ces mutants rII et rIII forment des plages de type sauvage r^+ . Cependant, les deux types de souches B sont l'une et l'autre $B(X)^+$.

On connaît également des souches d'E. coli B dont la sensibilité aux radiations diffère de celle de la souche B d'origine (Tableau I). La souche B/r (Witkin 1947) est beaucoup plus résistante aux rayonnements ultra-violets et X, alors que la souche Bs (Hill 1958) est plus sensible à ces radiations que la souche B classique. L'une et l'autre de ces souches sont du type $B(X)^+$. Il a d'ailleurs été indiqué plus haut que les deux souches $B(X)^+$ et $B(X)^-$ ont la même sensibilité à la lumière ultra-violette.

Un cas intéressant est celui de la souche d'E. coli dite Bordet qui est conservée depuis plus de trente ans à l'Institut Pasteur (Service du bactériophage). Cette souche est sensible aux phages de la série T et certains mutants résistants à ces bactériophages sont, comme ceux de la souche B, auxotrophes pour des caractères particuliers (Wollman 1947 a et b). Or, cette souche Bordet d'E. coli est du type $B(X)^+$: infectée par un bactériophage P_2 provenant de bactéries Sh, elle donne comme la souche B, le phénomène de variation conditionnée par l'hôte, et parmi les phages de la descendance, on trouve des phages de type P_2 Hybride. Il semblerait donc que les souches E. coli B et E. coli Bordet aient la même origine et que la première soit dérivée de la

seconde. En effet, la souche B d'E. coli (Delbrück et Luria 1942) provenait du laboratoire de Bronfenbrenner où elle avait été conservée depuis de nombreuses années (Kalmanson et Bronfenbrenner 1939). Il paraît vraisemblable qu'il s'agissait de la souche d'E. coli couramment utilisée par Gratia (1921) et par Bordet et Ciuca (1920) dans leurs travaux sur les bactériophages d'E. coli.

On peut donc conclure de ces expériences que les seules propriétés actuellement connues qui distinguent les souches $B(X)^+$ et $B(X)^-$ sont, d'une part la sensibilité des bactéries $B(X)^-$ au phage P_2 Hybride alors que les bactéries $B(X)^+$ lui sont immunes, et d'autre part la capacité des bactéries $B(X)^+$ de donner naissance à des phages P_2 Hybride lorsqu'elles sont infectées par un bactériophage P_2 .

CARACTERE DEFECTIF DU PROPHAGE X

L'ensemble des résultats qui précèdent indique que les bactéries $B(X)^+$ portent un prophage dont les bactéries $B(X)^-$ sont dépourvues. Or, ainsi que nous l'avons rappelé, le fait que la souche B d'E. coli pût être lysogène n'avait jamais été soupçonné. Ce seul fait, étant donné le nombre considérable de travaux réalisés avec cette souche, laissait pressentir qu'il ne pouvait s'agir d'une souche lysogène normale. Il convenait cependant de rechercher d'une manière systématique des bactériophages correspondant au prophage X.

Recherche de bactériophages correspondant au prophage X

Le caractère lysogène d'une souche peut ne pas être décelé si l'on ne dispose pas d'une souche indicatrice convenable. D'autre part, lorsqu'on a affaire à une souche lysogène défective, la quantité de bactériophage produit peut être si faible que ce phage peut passer inaperçu. Des filtrats de culture d'E. coli B ont donc été essayés sur une variété de souches sensibles à la fois au phage P_2 et au phage P_2 Hybride, en particulier sur les souches Sh, E. coli Kl2, E. coli C. Jamais aucun phage n'a pu être observé. Les différentes souches $B(X)^-$ qui sont toutes sensibles à P_2 et P_2 Hybride, n'ont pu, elles non plus, révéler, la présence d'un tel phage, que cette recherche fut faite avec des surnageants de culture d'E. coli B non traités ou avec des surnageants de culture préalablement soumises à l'action de la lumière ultraviolette.

L'hypothèse pouvait être émise que les souches $B(X)^-$ sont résistantes au phage X et que la capacité du phage P_2 Hybride de s'adsorber et de se développer dans les bactéries $B(X)^-$ serait une propriété héritée du phage P_2 et non du phage X. Quoique cette hypothèse fut peu vraisemblable, on a cependant cherché à induire la production de mutants d'E. coli $B(X)^-$ sensible à l'hypothétique phage X. Des cultures de ces bactéries ont été irradiées par la lumière ultra-violette et les bactéries survivantes étalées sur milieu gélosé. Les colonies en voie de développement ont été vaporisées avec des filtrats de culture d'E. coli $B(X)^+$ irradiés ou non irradiés, selon la technique

utilisée plus haut pour l'isolement de la souche B(X)⁺. Aucune colonie présentant une lyse partielle n'a pu être décelée parmi quatre vingt mille colonies examinées.

Ainsi, quelque soient les efforts déployés, il n'a jamais été possible de déceler la présence de bactériophages correspondant au prophage X. Force est donc de conclure que la souche B(X)⁺ est une souche lysogène défective dont le prophage est incapable de se développer, même avec une probabilité faible, en bactériophages infectieux. Des mutations de ce prophage défectif vers la normale, même se produisant à faible fréquence, n'ont pu être décelées ni induites,

Analyse du caractère défectif du prophage X

Les résultats qui précèdent indiquent que les bactéries B(X)⁺ perpétuent un prophage défectif. Les moyens permettant de mettre en évidence un tel prophage et d'analyser ses caractères, consistent à infecter des bactéries lysogènes défectives par un bactériophage apparenté. C'est d'ailleurs de cette façon que l'existence du prophage X a été démontrée au cours d'expériences de surinfection par le bactériophage P₂.

Recherche d'une coopération par le bactériophage P₂ avec le prophage X. Un bactériophage défectif étant incapable d'effectuer certaines des fonctions nécessaires à l'accomplissement du cycle de multiplication, on peut tenter d'y suppléer par infection par un bactériophage normal apparenté. De telles expériences de coopération peuvent être réalisées surtout dans le

cas de prophages inductibles tel que le bactériophage λ (Appleyard 1956 Jacob et Wollman 1956, Jacob, Fuerst et Wollman 1957, Arber, Kellenberger et Weigle 1957). Au cours de telles expériences, les bactéries lysogènes induites et surinfectées libèrent un mélange de particules normales et de particules défectives. Les chances de réussite sont beaucoup moindres dans le cas de prophages non inductibles, puisque la coopération ne peut être effectuée que dans celles des bactéries où le génome phagique est passé de l'état prophage à l'état végétatif.

Des expériences de ce type ont été tentées en infectant des bactéries $B(X)^+$ par un bactériophage P_2 provenant de bactéries $B(X)^-$. Le lysat ainsi obtenu a servi à infecter des bactéries $B(X)^-$ et on a recherché parmi les bactéries survivantes la présence de bactéries lysogènes défectives du type $B(X)^+$. Aucune bactérie de ce type n'a pu être décelée.

Le résultat négatif de ces expériences de coopération joint au fait que des mutations du prophage défectif X vers la forme normale n'ont jamais été observées indiquent que le défaut du prophage X n'est pas le fait d'une simple mutation mais qu'il s'agit d'un défaut fonctionnel important tel que ceux qui résultent de délétions. Dans des cas de ce genre, on peut évaluer l'importance du défaut porté par le prophage défectif par des expériences de recombinaison génétique.

Recherche d'une restauration de bactériophages inactivés par la lumière ultra-violette. Lorsque des bactériophages inactivés par la lumière ultra-violette sont adsorbés d'une part sur des bactéries non lysogènes

et d'autre part sur des bactéries lysogènes pour un bactériophage apparenté, on observe dans le second cas, qu'une fraction assez importante des phages inactivés sont restaurés (Jacob et Wollman 1953). Cette restauration est la conséquence d'une recombinaison génétique entre le phage inactivé et le prophage. Elle s'observe également dans le cas de bactéries lysogènes défectives (Jacob et Wollman 1956). Dans le cas du prophage défectif λ dg, où l'on sait qu'un segment du génome phagique est remplacé par un segment du génome bactérien, Arber et Kellenberger (1958) ont observé que de telles bactéries lysogènes défectives restaurent encore, quoiqu'à un moindre degré que des bactéries lysogènes normales, des bactériophages λ inactivés par la lumière ultra-violette.

Des expériences analogues ont été réalisées en infectant par des bactériophages P_2 Hybride irradiés des bactéries $B(X)^-$, $B(X)^+$, $B(X^-P_2^+)$ et $B(X^-P_2 \text{ Hybride}^+)$. Les résultats d'une telle expérience sont présentés sur la figure 9. On voit qu'aucune restauration n'est observée avec les bactéries $B(X)^-$, $B(X)^+$, alors qu'une restauration très nette est observée avec les bactéries $B(P_2)$ et $B(P_2 \text{ Hybride})$.

La sensibilité de la méthode peut être encore accrue si l'on irradie préalablement les bactéries, avant l'infection par les bactériophages irradiés (L.E. Bertani 1960). L'expérience précédente a donc été répétée dans ces conditions (Tableau VI). On voit que même dans ce cas, on ne peut déceler aucune différence significative entre le nombre des plages formées après infection de bactéries $B(X)^+$ et infection de bactéries $B(X)^-$.

Les résultats d'Arber et Kellenberger (1958) rapportés ci-dessus montrent que les bactériophages ayant

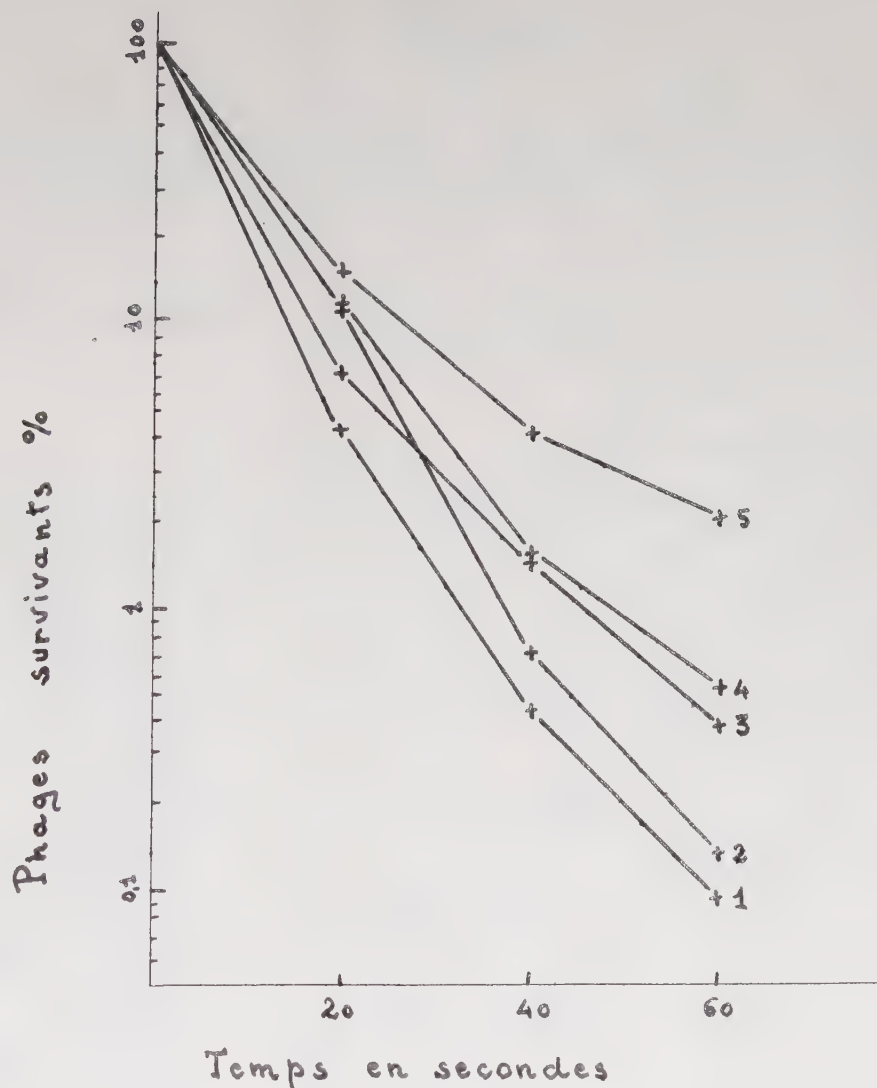


Figure 9

Restauration d'un phage P2 Hybride traité par la lumière ultra-violette par étalement sur différents hôtes. Un lysat de P2 Hybride (souche n° 3 du tableau II) est dilué au 1/100 en tampon et irradié à 0° pendant des temps variables. Une dilution convenable est ensuite préadsorbée pendant 15 minutes sur les différentes souches indiquées puis la suspension est étalée sur boîte de Pétri. En abscisse : la dose de lumière ultra-violette (en secondes). En ordonnée : le nombre de phages survivants (en %). Les différentes courbes représentent la survie du phage irradié selon qu'il est étalé sur :

- 1) $B(X)^+$, 2) $B(X)^-$, 3) $B(P2)^+(X)^-$, 4) $B(P2)^+(P2 \text{ Hybride})^+$
- 5) $B(P2 \text{ Hybride})^+(X)^-$

TABLEAU VI

Restauration d'un phage P_2 Hybride traité par la lumière ultra-violette,
par étalement sur différents hôtes eux-mêmes irradiés.

	Survie en % de phages P_2 Hybride irradiés puis préadsorbés sur les bactéries indiquées				
Doses de lumière UV auxquelles les bactéries ont été soumises.	$B(X)^-$	$B(X)^+$	$B(P_2)$	$Bc(P_2 Hy)$	$B(P_2+P_2Hy)$
Bactéries irradiées 0 seconde	0,13%	0,1%	0,38%	2,3%	0,5%
Bactéries irradiées 7 secondes	0,2%	0,15%			
Bactéries irradiées 40 secondes	0,5%	0,3%			
Bactéries irradiées 2 minutes	3,4%	3,1%			
Bactéries irradiées 5 minutes	0,3%	0,3%	2,7%	7,7%	4,4%

Un phage P_2 Hybride (souche 3 du tableau II) a été soumis pendant 60 secondes à la lumière ultra-violette, puis préadsorbé pendant 15 minutes sur différentes suspensions bactériennes. Dans le cas où il s'agit de bactéries qui ont été elles mêmes irradiées, ces suspensions sont ensuite étalées sur boîtes de Pétri en présence des mêmes bactéries non irradiées.

reçu un grand nombre de lésions sont mieux restaurés par un prophage normal que par un prophage dont le génome comporte une délétion assez importante. On peut donc admettre que la restauration est proportionnelle à la quantité d'ADN phagique contenu dans le prophage. Le pouvoir de restauration d'un prophage comportant une délétion considérable serait donc extrêmement réduit. Tel pourrait être le cas du prophage X des bactéries $B(X)^+$.

Recombinaison génétique entre le prophage X et le bactériophage P_2 . On sait qu'après infection de bactéries $B(X)^+$ par un bactériophage P_2 , une recombinaison génétique peut se produire entre le bactériophage P_2 et le prophage X, donnant ainsi naissance au phage P_2 Hybride. En infectant des bactéries $B(X)^+$ par des bactériophages P_2 marqués, on peut donc obtenir des renseignements sur la structure génétique du prophage X. La carte génétique du bactériophage P_2 étant très mal connue, les résultats obtenus auront un caractère plus qualitatif que quantitatif. Si, dans ces expériences, tous les phages hybrides formés ont le caractère apporté par le type parental P_2 , on en conclura que l'allèle correspondant n'existe pas chez le prophage X. Si, au contraire, ce caractère ne se retrouve que chez une fraction des phages hybrides formés, on en déduira que le prophage X possède la région allélique correspondante. Enfin, si un marqueur du bactériophage P_2 n'apparaît jamais chez les phages P_2 Hybride, c'est que ce marqueur est situé dans la région qui détermine l'immunité caractéristique du phage P_2 Hybride. Ces trois types de résultats ont été obtenus dans les différents croisements réalisés.

La technique utilisée pour obtenir des hybrides correspondants à différents mutants du phage P_2 a été décrite ci-dessus (page 25). Dans la plupart des cas, la souche indicatrice utilisée pour mettre en évidence les phages P_2 Hybride est lysogène pour le mutant du phage P_2 qui a servi à l'expérience. Cette précaution a été prise de manière à éviter une recombinaison possible entre le phage P_2 Hybride formé et le bactériophage produit par les bactéries indicatrices.

Les résultats suivants ont été obtenus :

- les marqueurs rd et rdl (morphologie des plages) du type parental P_2 se retrouvent régulièrement chez l'hybride (sur 125 hybrides isolés, 124 étaient effectivement rd , le dernier cas étant douteux),

- les marqueurs clairs (c) et virulents faibles ($vir1$ et vir) qui affectent le pouvoir lysogénisant du phage P_2 ne se retrouvent jamais chez l'hybride. Comme chez les autres phages tempérés, les marqueurs qui déterminent l'immunité spécifique et le pouvoir lysogénisant sont donc situés dans la même région, et se sont révélés dans ce cas, indissociables.

Toutefois, une exception mérite d'être signalée : c'est celle des phages clairs appartenant au groupe fonctionnel B décrit par L.E. Bertani (1960) (en l'espèce le double mutant $rd2\ vir19$). Ces phages sont capables de lysogéniser la souche C d'E. coli, sur laquelle ils forment des plages troubles, alors qu'ils forment des plages claires sur Shigella. Lorsqu'on infecte des bactéries $B(X)^+$ par un tel phage, la grande majorité des hybrides obtenus forment,

comme le type parental P_2 , des plages claires sur *Shigella* et troubles sur *E. coli* C. Il faut donc conclure que le marqueur *vir19* n'est pas localisé dans la région "claire" du phage P_2 et que le prophage X ne possède pas la région allélique correspondante. Les quelques phages hybrides formant des plages troubles sont vraisemblablement des mutants réverses du locus *vir19* (L.E. Bertani 1960).

Enfin, le marqueur qui gouverne le besoin en calcium pour l'adsorption du phage P_2 est tantôt hérité de P_2 , tantôt hérité de X (sous la forme allèle sauvage).

Les résultats de ces expériences semblent donc confirmer l'hypothèse émise ci-dessus. En dépit du faible nombre de marqueurs du bactériophage P_2 dont nous pouvions disposer, il apparaît que seuls les marqueurs de la région claire, et peut-être celui qui a trait au besoin de calcium pour l'adsorption, sont représentés dans le génome du prophage X. Celui-ci serait donc non seulement défectif mais son défaut porterait sur un segment très important de son matériel génétique. Le fait qu'un marqueur conférant le phénotype clair sur *Shigella* (*vir19*) ne possède pas de contrepartie sur le prophage X renforce ce point de vue. Si l'on raisonne par analogie avec ce que l'on sait d'autres phages tempérés dont la carte génétique est mieux connue que celle de P_2 , on est amené à conclure que le prophage X est réduit à un segment relativement court de son matériel génétique, c'est-à-dire essentiellement à la région qui porte les déterminants de l'immunité. Chez le bactériophage λ , cette région représente environ le vingt-cinquième du génome du bactériophage.

Les expériences rapportées dans ce chapitre ont montré que l'unité génétique présente dans les bactéries de la souche B d'E. coli et responsable de l'apparition du phage P₂ Hybride a tous les caractères d'un prophage. Tout d'abord, des bactéries ne possédant plus cette unité génétique ont été isolées. Ces bactéries B(X)⁻ ne sont plus immunes au phage P₂ Hybride. Cependant, et quelque soient les moyens déployés, il n'a jamais été possible de mettre en évidence des bactériophages correspondant au prophage X. Il fallait en conclure qu'on avait affaire à un prophage défectif. Cependant, le fait qu'on n'observe aucune coopération entre le bactériophage P₂ et le prophage X, le fait surtout qu'aucune restauration appréciable de bactériophages P₂ inactivés par la lumière ultra-violette n'ait pu être obtenue, indiquent que le défaut du prophage X est plus qu'un défaut fonctionnel, et qu'il s'agit vraisemblablement d'une délétion portant sur un segment considérable du génome phagique. Les résultats d'expérience de recombinaison génétique entre des phages P₂ marqués et le prophage X ont tout à fait confirmé ce point de vue. Ces expériences conduisent à conclure que le prophage X serait en fait réduit à un segment extrêmement court de son matériel génétique. C'est ce que vont tenter de vérifier les expériences rapportées dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA DENSITE DES BACTERIOPHAGES P_2 ET P_2 HYBRIDE

Les résultats rapportés dans le chapitre précédent indiquent que les bactéries E. coli B perpétuent un prophage défectif, le prophage X. Ce prophage serait réduit à un segment relativement court de matériel génétique ne comportant pas la plupart des gènes nécessaires à la multiplication végétative et à la maturation de ce bactériophage. Cependant, lorsque des bactéries B sont infectées par le bactériophage P_2 , une recombinaison génétique peut se produire entre ce bactériophage et le prophage X, avec formation de phages P_2 Hybride, capables de conférer l'immunité caractéristique du prophage X. Le génome de ces hybrides semble constitué, pour sa plus grande part, par celui du phage P_2 et ne contient apparemment qu'un petit segment correspondant au prophage X.

La mise au point par Meselson, Stahl et Vinograd (1957) de la méthode de centrifugation en gradient de densité permet de séparer selon leur densité non seulement des particules telles que des bactériophages, mais même des acides desoxyribonucléiques d'origines différentes. Cette méthode, appliquée aux bactériophages, a permis de démontrer que des bactériophages appartenant à des groupes différents possèdent des densités différentes, et que, dans un même groupe de phages apparentés, il peut exister, d'un type de phage à l'autre, de légères différences de densités spécifiques. C'est ainsi que les phages λ et 434 peuvent

être distingués par leurs densités spécifiques (Cousin, résultats inédits) . Pour un même bactériophage, tel que λ , des mutations peuvent se produire qui affectent la densité des particules (Kellenberger, Zichichi et Weigle 1960). Dans ce dernier cas, les auteurs ont pu démontrer que les densités particulières des "mutants de densité" des phages λ étaient génétiquement déterminées et correspondaient à des différences dans le contenu en ADN de ces phages. Rappelons enfin que dans le cas des bactériophages λ capables de transduire le caractère galactose (phages défectifs λ dg) des phages isolés indépendamment présentent toute une gamme de densités différentes, ces différences étant ensuite héritables (Weigle Meselson et Paigen 1959). Ici encore, les différences observées reflètent des différences dans le contenu en ADN des particules phagiques, différences qui sont elles-mêmes la conséquence d'événements de recombinaisons non réciproques entre le bactériophage λ et le chromosome bactérien.

On pouvait se demander si des différences de densité ne pourraient être observées entre le bactériophage P_2 d'une part et le bactériophage P_2 Hybride d'autre part. L'existence de telles différences constituerait une preuve matérielle de la nature hybride de ce dernier phage et pourrait donner des renseignements sur la manière dont s'effectue la recombinaison entre le prophage X et le bactériophage P_2 .

Les résultats de ces expériences ont fait l'objet d'une note préliminaire (Cohen (Cousin) 1960).

METHODE D'ETUDE ET SES POSSIBILITES

Principe de la méthode

La méthode de séparation de macro-molécules ou particules par centrifugation à l'équilibre en gradient de densité a été mise au point par Meselson, Stahl et Vinograd (1958). Lorsqu'une solution suffisamment dense de chlorure de césium ($1,50 \text{ g/cm}^3$ par exemple) est centrifugée sous une accélération de l'ordre de cent mille g, un équilibre s'établit entre les forces de sédimentation et de diffusion, équilibre qui se manifeste par la formation d'un gradient de concentration du chlorure de césium et par conséquent d'un gradient de densité. Des molécules de densité voisine de la densité de la solution saline à centrifuger peuvent être introduites dans cette solution. Au cours de la centrifugation lorsque le gradient se formera, ces molécules viendront se placer dans la région où la densité de la solution sera égale à la leur. Si un mélange de telles molécules de densités voisines est ainsi centrifugé, ces molécules seront séparées, chacune se plaçant à la densité qui lui est propre. Cette méthode permet donc d'identifier et de séparer des macromolécules grâce à leur densité.

Séparation des fractions

Le principe qui vient d'être décrit peut être mis en application au moyen d'une centrifugeuse munie d'un rotor à godets oscillants. Ces derniers se plaçant horizontalement pendant la centrifugation, le gradient de densité se trouve représenté à la fin de l'expérience par une série

continue de couches horizontales de densité croissante à partir du ménisque. Grâce à la méthode, mise au point par Weigle et collaborateurs (1959), on peut reproduire dans une série de fractions le gradient établi dans le tube. Ce résultat est atteint en perçant le fond du tube et en fractionnant la totalité du liquide en une succession de gouttes recueillies séparément dans une série de tubes. On mesure l'indice de réfraction des premières et des dernières gouttes pour en déduire la densité des échantillons des extrémités du gradient. Ce dernier n'étant pas linéaire, et sa fonction exacte impossible à déterminer au cours d'une expérience de ce type, on ne pourra déduire de ces deux valeurs de densité extrêmes qu'une valeur approximative de la densité des échantillons situés à une place quelconque du gradient. Les produits biologiques présents dans chaque fraction peuvent être identifiés par leurs propriétés spécifiques. Ainsi leur répartition dans le gradient se trouve établie et par conséquent leur densité approximative déterminée. Cette méthode s'applique remarquablement bien aux phages.

Analyse des résultats

1) Distribution des phages d'une population en fonction de la densité. On peut tracer une courbe en portant en abscisse le numéro d'ordre des gouttes collectées et en ordonnée le titre des phages de la goutte correspondante. Or, à chaque goutte correspond une valeur de la densité ; pour traduire en densité la position d'un point quelconque du gradient, représentée par le numéro d'ordre de la goutte, nous connaissons les valeurs mesurées

des densités des premières et des dernières gouttes. De ces deux valeurs extrêmes, on peut déduire très approximativement la densité de chaque goutte. Nous pouvons donc considérer à présent que la courbe ainsi tracée représente la distribution des phages en fonction de la densité.

Les paramètres qui définissent une telle courbe sont :

- 1) la densité au maximum de concentration en phage
- 2) la largeur à mi-hauteur du maximum $-1 \frac{1}{2}$).

A titre d'exemple, une courbe de distribution du phage P_2 est représentée sur la figure 10, en mettant en évidence les valeurs que nous venons d'étudier.

Si, dans un mélange de deux bactériophages, chacun d'eux peut être identifié séparément grâce à un moyen sélectif, la comparaison de leurs densités peut être abordée dans les conditions les plus favorables. En effet, après centrifugation, une courbe de distribution correspondant à chacun des deux types pourra être établie. Dans le cas où les densités des deux phages sont différentes, les deux courbes se trouvent alors décalées l'une par rapport à l'autre, l'écart entre les densités au maximum de concentration de chaque phage exprimant la valeur de la différence de densité entre les deux types de particules.

2) Rapports des titres de deux bactériophages.

Cependant dans le cas d'un mélange, si la différence de densité entre les deux phages étudiés ne correspond qu'à un écart de quelques gouttes, les deux courbes sont assez peu décalées l'une par rapport à l'autre. Une manière beaucoup

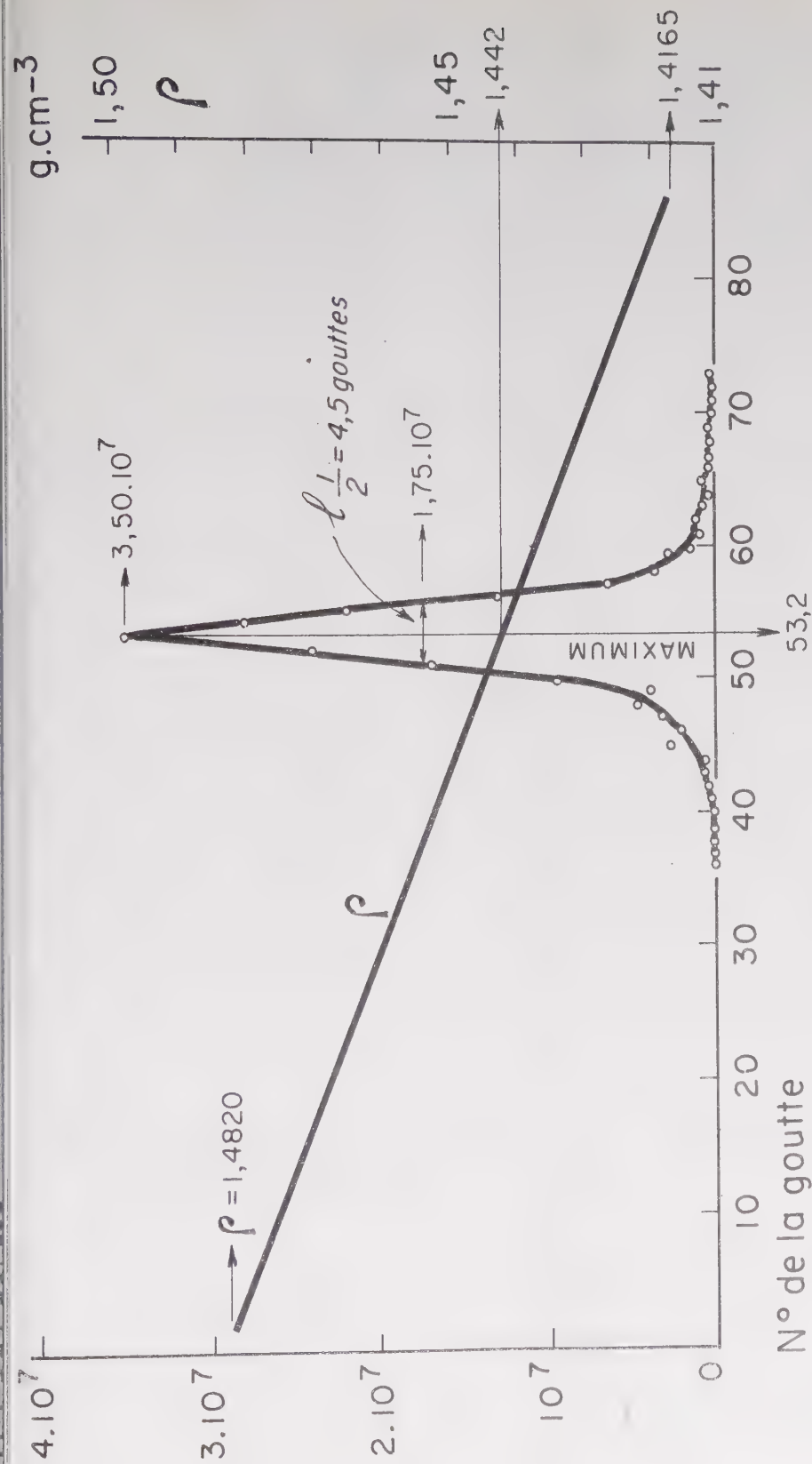


Figure 10

Illustration des paramètres définissant une courbe de distribution des phages en fonction de leur densité. Par le trou percé au fond du tube, 86 gouttes se sont écoulées ; les densités de la première et de la dernière ont été mesurées et sont égales respectivement à $1,4820$ et $1,4165 \text{ g.cm}^{-3}$. La droite qui joint ces deux points permet de déterminer une valeur très approximative de la densité de n'importe quelle goutte. (la pente de cette droite est égale à $7,62 \text{ g.cm}^{-3}$ par goutte). On a titré le phage P2 contenu dans chaque goutte. On voit que le maximum de la courbe correspond aux gouttes 53 et 54 (53,2), c'est-à-dire à la densité $1,442 \text{ g.cm}^{-3}$. La largeur de la courbe, mesurée à mi-hauteur du maximum est égale à $1 \frac{1}{2} = 4,5$ gouttes, c'est-à-dire égale à $0,0034 \text{ g.cm}^{-3}$.

plus démonstrative d'illustrer l'écart qui sépare les deux maximums consiste à tracer la courbe du rapport des nombres de chaque type de phage contenu par goutte, en fonction du numéro d'ordre de celle-ci. On conçoit aisément que ce rapport varie considérablement dans la zone des deux maximums de densité, puisque, dans cette région, la concentration d'un type de particule diminue, alors que celle de l'autre type augmente. De plus, cette manière de présenter les résultats des titrages est indépendante des imperfections de collecte, telle que perte partielle ou volume variable des gouttes collectées. Elle est donc, pour ces deux raisons, beaucoup plus sensible que la représentation précédente où de telles fluctuations se traduiraient par des points aberrants de la courbe de distribution, fluctuations particulièrement gênantes dans la zone de concentration maximum où une faible erreur de cet ordre peut conduire à un tracé tout différent de la courbe. Cependant, il faut remarquer que cette méthode qui est très sensible pour déceler une différence de densité entre deux phages, ne permet pas de déterminer la valeur de cette différence. En effet, si la chute du rapport est évidemment fonction de la différence de densité, elle est tout autant fonction de la largeur à mi-hauteur, elle-même fonction du volume des gouttes.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Différence de densité entre les phages P_2 et P_2 Hybride

Le but de l'expérience est de comparer les densités de phages P_2 et P_2 Hybride. Un stock de phages P_2 Hybride

est préparé en infectant des bactéries *Sh dysenteriae* à partir d'une plaque formée sur ces mêmes bactéries indicatrices. Un stock de phages P_2 sauvage est préparé de la même manière. Un mélange de ces deux phages, mis en suspension dans une solution aqueuse de chlorure de césium de densité 1,45, est centrifugé pendant seize heures à quarante deux mille g. Ensuite le liquide est fractionné de la manière décrite plus haut. Les deux types de phages contenus dans chaque goutte sont ensuite titrés par étalement d'une part sur bactéries indicatrices $Sh(P_2)$ et d'autre part, sur bactéries $Sh(P_2 \text{ Hy})$. On obtient ainsi, pour chacun des deux phages du mélange centrifugé, une courbe représentant la distribution des phages en fonction de la densité. Trois expériences de ce type ont été effectuées et ont donné des résultats très voisins. Dans chacune d'elles, les deux courbes sont décalées, l'hybride étant le phage le plus dense. Nous examinerons successivement la valeur des deux paramètres définissant les courbes de distribution obtenues.

1) Densité au maximum de concentration en phage.

La différence entre les densités correspondant au maximum de concentration de chaque phage peut être évaluée très approximativement à $19 \cdot 10^{-4} \text{ gcm}^{-3}$ dans l'expérience illustrée par la figure 11 et 18 et $20 \cdot 10^{-4} \text{ gcm}^{-3}$ dans les deux autres. Nous avons vu précédemment que lorsque la différence de densité est faible, elle peut être mieux mise en valeur en exprimant le rapport des titres des deux types de phage en fonction de leur position dans le gradient. La figure 12 A montre la variation de ce rapport dans la région du gradient où se localisent les maximums de concentration des phages P_2 et P_2 Hybride. Par contraste, la

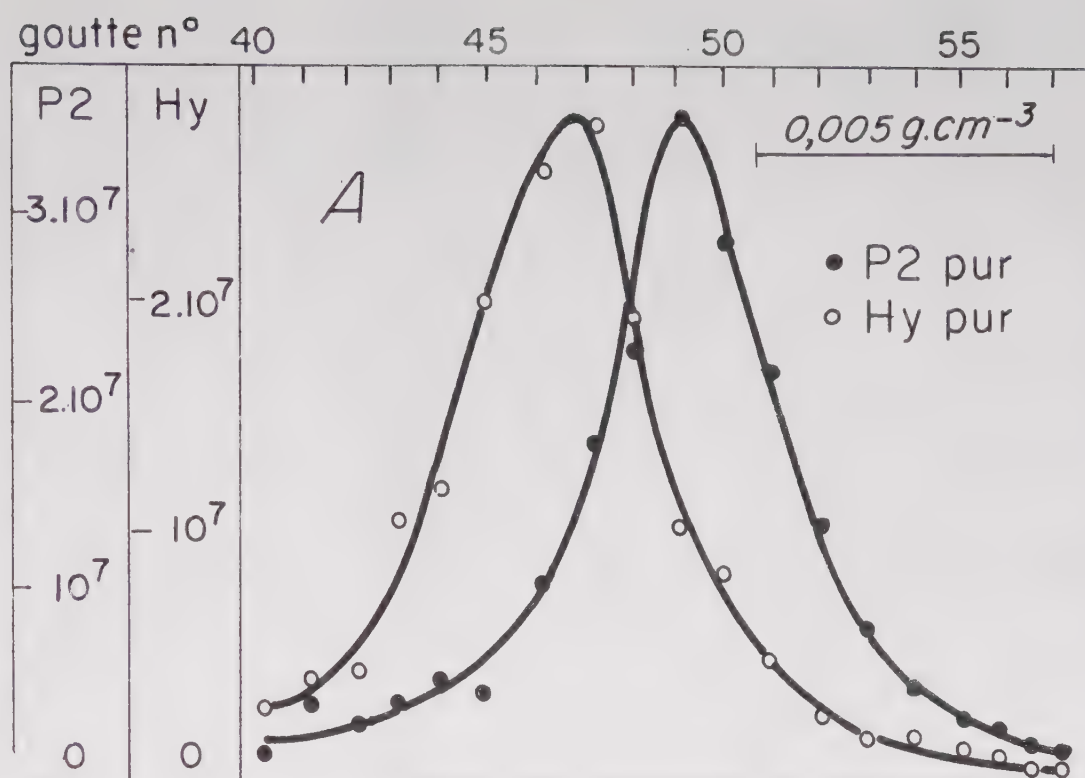


Figure 11 A

Différence de densité entre les phages P2 et P2 Hybride. 3 ml d'un mélange des bactériophages P2 et P2 Hybride sont centrifugés dans un gradient de densité et le fractionnement réalisé sans perte. Les densités des premières et des dernières gouttes sont mesurées. Dans cette expérience, qui correspond à un mélange artificiel de phages P2 et P2 Hybride, 38 gouttes ont été recueillies. En abscisse : les numéros d'ordre des différentes gouttes. En ordonnée : le nombre de phages de chaque type par goutte. L'échelle correspondant au titre de chaque type de phage est indiquée.

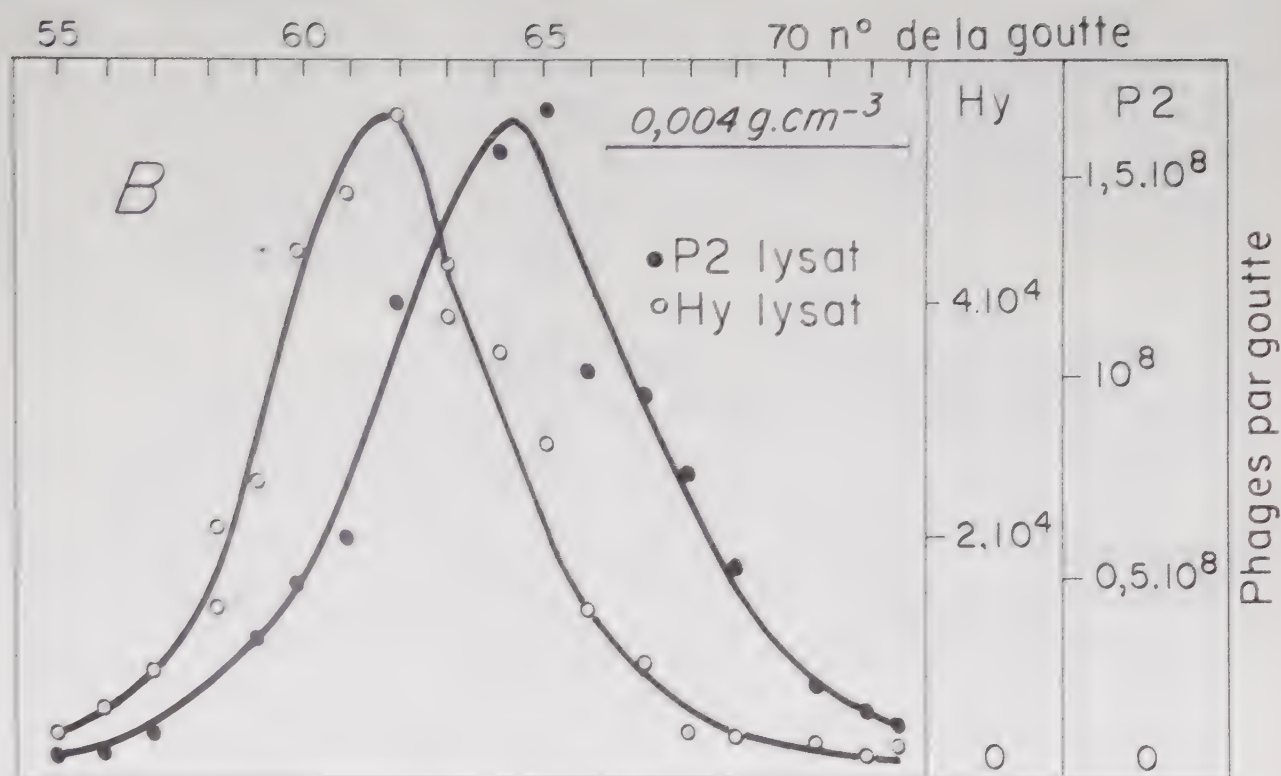


Figure 11 B

Différence de densité entre les phages P2 et P2 Hybride.
 3 ml d'un mélange des bactériophages P2 et P2 Hybride sont centrifugés dans un gradient de densité et le fractionnement réalisé sans perte. Les densités des premières et des dernières gouttes sont mesurées. Dans cette expérience, où il s'agit d'un lysat de phage P2 préparé sur *E. coli* B(X)⁺, 136 gouttes ont été recueillies. En abscisse : les numéros d'ordre des différentes gouttes. En ordonnée : le nombre de phages de chaque type par goutte. L'échelle correspondant au titre de chaque type de phage est indiquée.

figure 12 B montre la constance de ce même rapport lorsque l'on a affaire à un mélange de deux phages de densités identiques.

Il n'est pas douteux que la différence de densité observée entre les phages P_2 et P_2 Hybride est significative. En effet, deux types de mélanges témoins ont été centrifugés dans les mêmes conditions et ne montrent pas de différence appréciable.

a) c'est le cas, d'une part, d'un mélange de phages P_2 et de l'un de ses mutants (différence inférieure à $3 \cdot 10^{-4} \text{ gcm}^{-3}$)

b) c'est le cas, d'autre part, de deux lysats du même phage P_2 Hybride, l'un issu de *Shigella*, l'autre issu de *coli B(X)⁻*. On n'observe pas non plus de différence de densité dans ces conditions.

Cette expérience prouve en outre que la modification phénotypique qui se produit lorsque le phage P_2 Hybride se multiplie successivement dans *Shigella dysenteriae* puis dans *E. coli B*, n'entraîne pas de modification de la densité de ce phage. Notons que le système dont nous disposons est particulièrement favorable à une étude de ce type. En effet, lorsqu'après infection de bactéries $B(X)⁺$ par un bactériophage P_2 , des phages P_2 Hybride sont formés et isolés sur bactéries $B(X)⁻(P_2)$, puis qu'un stock de P_2 Hybride est préparé sur bactéries $B(X)⁻$, les phages P_2 Hybride produits se sont d'une manière constante reproduits dans *E. coli B*. Lorsque de tels phages sont ensuite passés sur *Sh. dysenteriae*, on est donc assuré que ces phages ont été pour la

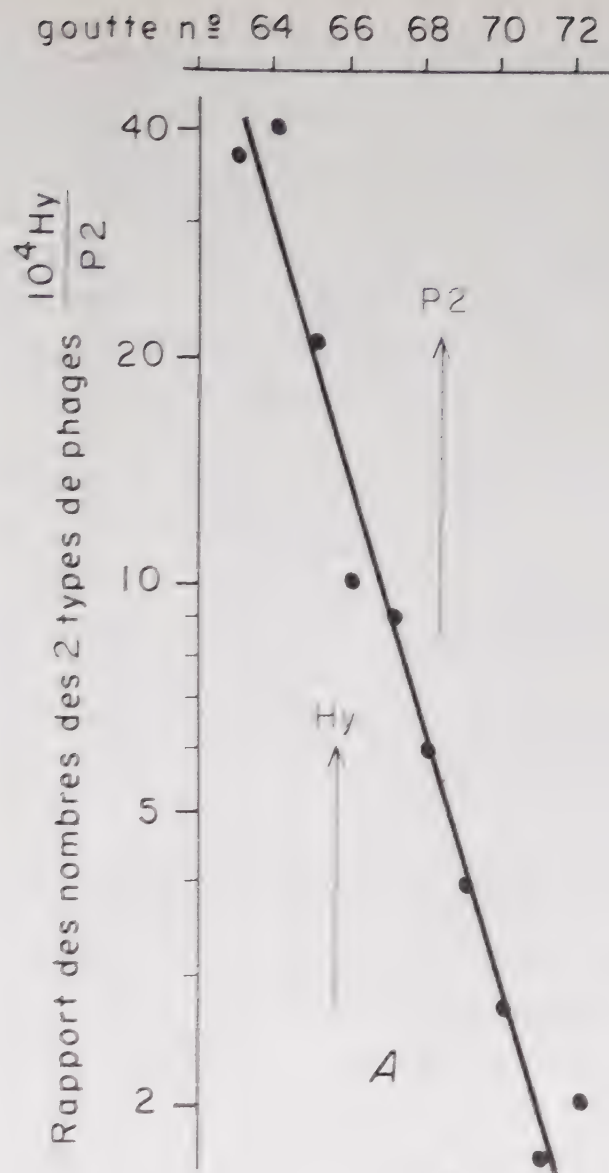


Figure 12 A

Les bactériophages produits au cours de la multiplication de P2 dans E. Coli B sont centrifugés dans un gradient de densité en CsCl_2 , puis fractionnés en une série de gouttes. Des phages de chaque type contenus dans chacune des gouttes sont dénombrés sur bactéries indicatrices (fig. 11 B) ; En abscisse : le numéro d'ordre des gouttes dans la région des maximums des courbes de distribution en fonction de la densité. En ordonnée : le rapport des nombres des deux types de phages ($\frac{\text{Hy} \times 10^4}{\text{P2}}$) contenus dans chaque goutte. Les flèches indiquent les maximums des courbes de distribution de densité correspondant respectivement aux phages P2 et P2 Hybride.

première fois mis en contact avec ce nouvel hôte. Les résultats représentés sur la figure 12 B sont ceux d'une expérience où des phages P_2 Hybride préparés sur *E. coli* B comme il vient d'être indiqué, et des phages préparés sur *Shigella dysenteriae* ont été mélangés et centrifugés. On voit que les densités de ces phages "adaptés" à des hôtes différents sont rigoureusement identiques et ne peuvent être distinguées par les méthodes utilisées.

Des résultats tout à fait comparables ont été obtenus par Weigle et collaborateurs (1959) avec le bactériophage λ qui est lui aussi soumis à une variation conditionnée par l'hôte lorsqu'il se multiplie soit chez *E. coli* K12, soit chez *E. coli* C. Ici encore, aucune différence n'a pu être observée dans les densités des phages issus soit de l'une soit de l'autre souche.

2) Largeur à mi-hauteur du maximum. Un stock de bactériophages P_2 produit en un seul cycle de multiplication sur *Sh dysenteriae* peut être considéré comme représentant une population homogène de bactériophages P_2 . La moyenne des largeurs à mi-hauteur du maximum correspondant à neuf expériences distinctes de centrifugation d'un tel lysat est de $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ gcm}^{-3}$. De même, la moyenne des largeurs à mi-hauteur pour le phage P_2 Hybride est pratiquement égale à celle de P_2 : 3,3 , moyenne de trois expériences.

Comparaison des densités d'hybrides issus de multiples hybridations

Les particules hybrides des expériences précédentes sont les descendantes d'une particule unique, issue d'une hybridation particulière. On peut alors se demander si,

à la population hybride issue d'un grand nombre d'hybridations, correspondrait tout un ensemble de densités différentes qui se traduirait par un élargissement de la courbe correspondant aux hybrides.

L'expérience, comparable à la précédente, a été réalisée par la centrifugation d'un lysat obtenu en un seul cycle de multiplication du phage P_2 dans E. coli B : $2 \cdot 10^9$ P_2 y sont accompagnés de $7 \cdot 10^5$ hybrides, lesquels sont issus du même nombre d'hybridations distinctes (voir page 30). On constate à nouveau (figure 11 B) que les P_2 Hybride sont plus denses que les P_2 . La moyenne des différences de densité obtenues dans trois expériences de ce type ($16 \cdot 10^{-4} \text{ gcm}^{-3}$) est très voisine de celle obtenue précédemment dans le cas d'un hybride pur ($19 \cdot 10^{-4} \text{ gcm}^{-3}$).

Mais c'est l'examen des largeurs à mi-hauteur du maximum qui sera plus sensible à une hétérogénéité de densité de la population. Or, nous connaissons déjà la largeur à mi-hauteur d'un lysat pur de P_2 qui nous servira de référence. On constate que les valeurs des largeurs à mi-hauteur du maximum obtenues pour le mélange de phages P_2 et P_2 Hybride issu de bactéries $B(X)^+$ ne s'écartent pas de celles obtenues avec le lysat de référence de P_2 pur (moyenne de trois expériences : 3,4). On peut donc conclure que, dans les limites de cette méthode, tous les hybrides d'immunité X étudiés ont la même densité.

Toutefois, il est nécessaire de remarquer que la comparaison des largeurs à mi-hauteur des courbes est une méthode qui n'a pas un grand pouvoir de résolution. En effet, avec un phage donné, les courbes obtenues au cours d'expériences successives n'ont pas toujours la même largeur à mi-hauteur. D'autre part, lorsqu'au cours d'une même

expérience, on compare les densités des phages P_2 et P_2 Hybride, on peut titrer indépendamment chacun de ces phages sur bactéries indicatrices sélectives. On établit donc pour chacun de ces phages des courbes distinctes qui peuvent être comparées. Lorsqu'au contraire, on recherche si la population des hybrides est homogène en densité, c'est uniquement par leur densité que l'on tente de séparer les particules et ce moyen est beaucoup plus imprécis. Ainsi, les hybrides contenus dans un lysat de P_2 préparé sur *E. coli* B et qui s'y trouvent dans la proportion de 1/1.000 ne pourraient être décelés par ce moyen.

La méthode peut cependant être améliorée. Si, en effet, une population de phages est hétérogène, la courbe de densité obtenue représente la répartition des phages de densités variables autour de la valeur la plus souvent représentée. Donc, si l'on prélève des échantillons en des points variables de la distribution, ces échantillons contiendront une majorité de particules de densité correspondant à celle représentée par la position de l'échantillon dans le gradient. Si on centrifuge à nouveau ces différents échantillons, le maximum obtenu pour chacun d'eux sera décalé par rapport au maximum correspondant à l'ensemble de la population.

Un lysat de bactériophage P_2 , préparé sur *E. coli* B(X)⁺, est centrifugé. Trois fractions, prélevées dans les régions de densité supérieure à celle du maximum de la courbe correspondant à P_2 Hybride sont isolées (densités de 2,5 , 5 , et $7 \cdot 10^{-3} \text{ gcm}^{-3}$). Chacune de ces fractions est centrifugée à nouveau et l'on établit les courbes de distribution des phages P_2 et P_2 Hybride contenus dans chacune des gouttes collectées. Ces courbes ne diffèrent en aucune manière, tant pour les demi-largeurs que pour les

densités au maximum, des courbes obtenues avec le mélange initial. Aucune hétérogénéité n'a donc pu être décelée dans la population des phages P_2 Hybride dont chacun correspond à un événement de recombinaison différent. On peut donc conclure que, dans les limites de résolution de ces expériences, chaque P_2 Hybride formé possède la même densité.

o

o o

Il est bien évident que des causes multiples peuvent intervenir dans la modification de la densité de particules de bactériophages ; variation dans le rapport des masses des constituants, modification du volume, altération de l'enveloppe protéique, etc... Cependant, dans le cas du phage λ , qui est celui qui a été le mieux étudié, il a été démontré que les modifications de densités étaient dues à des modifications dans la teneur en ADN des particules phagiques et que ces modifications de densité avaient une expression génétique. Dans le cas qui nous occupe, il existe également une corrélation entre les différences de densité observées entre les phages P_2 et P_2 Hybride et l'événement génétique qui donne naissance à ce dernier phage. Nous adopterons donc l'hypothèse que les différences de densité qui existent entre les phages P_2 et P_2 Hybride sont dues à des différences dans leur contenu en ADN. Ces différences pourraient être d'ordre qualitatif ou d'ordre quantitatif. Etant donné que les phages P_2 et P_2 Hybride sont l'un et l'autre des phages tempérés et que la constitution chimique

de l'ADN des phages tempérés (c'est-à-dire le rapport A+T/G+C des bases puriques et pyrimidiques) est en général sensiblement le même que celui des bactéries hôtes, il apparaît peu vraisemblable que la différence de densité puisse tenir à une raison de cet ordre. D'ailleurs, la partie qui, dans le phage P₂ Hybride, correspond au prophage X semble être très petite, et il serait difficile de concevoir que la constitution chimique du prophage X soit à ce point différente de celle de la région homologue du phage P₂ pour pouvoir se manifester par une différence de densité des phages P₂ et P₂ Hybride. Il semble plus probable que la différence entre ces deux phages soit d'ordre quantitatif. Selon cette hypothèse, les phages P₂ Hybride contiendraient un peu plus d'ADN que les phages P₂. L'analyse des résultats obtenus permet d'évaluer cette différence à environ 2 % de la masse totale de l'ADN de P₂. Des différences de cet ordre ne semblent pas être très considérables, étant donné que des différences proches de 20 % ont été observées dans le cas des mutants de densité du bactériophage λ (Kellenberger, Zichichi et Weigle 1960).

Les bactériophages P₂ et P₂ Hybride présentent donc des densités différentes, et la différence observée est due selon toute apparence, à une différence dans les quantités d'ADN qu'ils contiennent. Ces résultats constituent l'expression matérielle de l'origine du phage recombinant P₂ Hybride. Ce phage aurait acquis du prophage X une quantité d'ADN légèrement supérieure à l'ADN de la région correspondante du phage P₂. L'événement recombinaison qui lui a donné naissance ne consiste donc pas en un remplacement quantitativement identique de la région du bactériophage P₂ responsable de l'immunité spécifique par la région correspondante du prophage X.

Un fait remarquable qui ressort également des résultats rapportés dans ce chapitre, c'est qu'aucune hétérogénéité ne semble exister dans une population de bactériophages P_2 Hybride provenant tous d'événements-recombinaison distincts. Si la recombinaison entre le prophage X et le bactériophage P_2 n'est pas rigoureusement équationnelle, on pourrait s'attendre en effet à ce que différents P_2 Hybride possèdent des densités légèrement différentes. C'est ce qui a été observé en effet dans le cas des bactériophages transducteurs λ dg qui présentent entre eux des différences de densité souvent considérables (Weigle, Meselson et Paigen 1959). Le fait qu'il n'en soit pas ainsi dans le cas des phages P_2 Hybride semblerait indiquer que si les longueurs des segments génétiques responsables de l'immunité chez P_2 et P_2 Hybride ne sont pas identiques, elles n'en sont pas moins rigoureusement définies. La région du phage P_2 qui est remplacée, aussi bien que la région du prophage X par laquelle elle est remplacée, seraient donc toujours les mêmes. Il a été suggéré que les phénomènes "d'incorporation génétique" seraient de nature différente des phénomènes de recombinaison génétique (voir Jacob et Wollman 1961 p. 293). Tandis que dans le second cas, l'échange génétique est en général réciproque, dans le premier, il ne l'est en général pas. La comparaison des résultats obtenus dans le cas des phages λ dg d'une part (Weigle, Meselson et Paigen, 1959) et dans le cas des phages P_2 Hybride d'autre part illustre cette différence. Alors que dans le premier cas la "recombinaison" génétique entre structures non homologues (génome phagique et génome bactérien) est en général non réciproque dans le second cas, au contraire, la recombinaison génétique semble être réciproque car elle se produit entre structures homologues.

CHAPITRE V

LA LOCALISATION GENETIQUE DU PROPHAGE X.

Les bactéries de la souche B d'E. coli contiennent une unité douée de continuité génétique, le prophage X, qui non seulement est physiologiquement défectif, mais semble aussi être matériellement incomplet. Le présent chapitre est consacré à l'étude de la localisation génétique de ce prophage.

Les études concernant le déterminisme génétique de la lysogénie ont montré que le prophage λ d'E. coli Kl2 peut être localisé sur le chromosome de la bactérie, en un locus qui lui est spécifique (Wollman et Jacob 1954 et 1957) et que différents prophages occupent sur le chromosome bactérien des positions différentes (Jacob et Wollman 1958 a). Dans le cas du bactériophage P_2 , il a été conclu que ce prophage peut occuper des positions différentes, l'une de ces positions étant toutefois occupée de préférence aux autres (Bertani 1956 - Bertani et Six 1958). Enfin dans le cas d'un bactériophage capable de transduction non spécifique chez E. coli Kl2, aucun site spécifique n'a pu être démontré (Jacob et Wollman 1961).

Il est donc important d'étudier la localisation génétique du prophage X et de déterminer si possible sa position sur le chromosome bactérien.

L'étude de la localisation génétique des prophages a été surtout réalisée avec la souche K12 d'E. coli, chez laquelle des phénomènes de recombinaison génétique ont été originellement démontrés par Lederberg et Tatum (1946 a et b). On sait que chez ces bactéries la conjugaison a lieu entre bactéries appartenant à des types sexuels différents, bactéries mâles ou donatrices, et bactéries femelles ou réceptrices (voir Wollman et Jacob 1959). La différenciation sexuelle est sous la dépendance d'un élément génétique particulier, le facteur sexuel F, qui est absent chez les femelles (F^-) et présent chez les mâles. Ceux-ci peuvent appartenir à deux types principaux, les types F^+ et Hfr, ces types sexuels étant déterminés par les relations que le facteur sexuel affecte avec le chromosome bactérien. Dans les croisements entre bactéries Hfr et F^- , on observe une haute fréquence de recombinaison, tout au moins pour certains marqueurs génétiques, mais le déterminant génétique du sexe n'est transmis qu'à une fréquence relativement faible. Dans les croisements entre bactéries F^+ et F^- , au contraire, le facteur F est transmis à haute fréquence et indépendamment des autres déterminants génétiques de la bactérie mâle qui, eux, sont tous transmis à basse fréquence (Hayes 1953 b). L'interprétation de ces faits est la suivante : chez les bactéries F^+ , le facteur sexuel est indépendant du chromosome bactérien et peut être transmis librement aux bactéries F^- à la faveur de la conjugaison. Chez les bactéries Hfr, au contraire, la transmission du chromosome au cours de la conjugaison est polarisée et le facteur sexuel est situé à l'extrémité distale du chromosome, celle qui passe le plus tard et par conséquent le plus rarement au cours de la conjugaison. Le facteur sexuel est

donc un élément épisomique (Jacob et Wollman 1958 b), qui peut exister dans une bactérie soit à l'état autonome (bactéries F^+) soit à l'état intégré (bactéries Hfr). Rappelons enfin qu'il existe différents types de bactéries Hfr, chaque type étant déterminé par la position occupée par le facteur sexuel intégré.

Si le système génétique d'E. coli K12 est maintenant bien connu, il n'en est pas ainsi pour E. coli B. Or le prophage défectif X dont on se propose de déterminer la localisation est présent chez E. coli B. On sait que ces bactéries sont F^- et qu'il est très difficile de les convertir en bactéries de type F^+ par contact avec des bactéries K12 F^+ (de Haan 1954, Calef et Cavalli 1955). L'isolement, à partir de ces rares souches B F^+ , de bactéries B Hfr, n'a jamais été décrit. Enfin, on ne dispose pas, dans le cas des bactéries B, d'une collection de souches génétiquement marquées.

Dans ces conditions, il est évident que pour tenter de localiser le prophage X, il était nécessaire d'avoir recours, tout au moins dans un premier temps, à des croisements entre bactéries de la souche B qui contient le prophage X et bactéries de la souche K12 génétiquement marquées et de types sexuels bien définis,

MATERIEL ET METHODES.

Souches bactériennes.

Au début de cette étude, nous ne disposions

que de souches B prototrophes. Nous avons commencé par isoler, après irradiation par la lumière ultra-violette, des souches incapables d'utiliser le lactose (lac^-) ou le galactose (gal^-). Nous avons pu ensuite obtenir, grâce à l'amabilité des Dr de Haan et Maas, des souches B génétiquement marquées. Enfin, nous avons à notre disposition les souches d'E. coli K12 des services de Physiologie et de Génétique bactérienne de l'Institut Pasteur. Une liste des souches utilisées dans la suite de cet exposé est donnée dans le tableau VII.

Deux des souches qui figurent dans ce tableau seront décrites ultérieurement; il s'agit des deux souches Hybrides entre E. coli K12 et E. coli B : d'une part une souche Hfr Hybride entre une souche B F^- et une souche K12 Hfr et portant le prophage X, et d'autre part, une souche F^- Hybride, également X^+ et issue d'un croisement entre la souche Hfr Hybride et une souche K12 F^- .

La nomenclature utilisée pour désigner les caractères de ces souches est en général celle qui est décrite dans l'ouvrage de Wollman et Jacob (1959). Toutefois, pour les besoins en facteur de croissance, nous avons adopté la nomenclature proposée par Demerec (1963).

Méthodes.

Les milieux et les techniques utilisées dans les croisements sont ceux qui sont décrits par Wollman et Jacob (1958, 1959). Rappelons que le milieu synthétique a la composition suivante : KH_2PO_4 , 6,8g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1g;

TABLEAU VII

Souches bactériennes utilisées dans les expériences de croisement.

Souches	Type sexuel	Caractères génétiques	Restriction du phage P ₂	Origine
<u>E. coli K12</u>				
PA 309	F ⁻	thr ⁻ leu ⁻ thi ⁻ arg ⁻ mtl ⁻ xyl ⁻ mal ⁻ Sm ^r his ⁻ try ⁻ gal ⁻ lac ⁻ λ^r	-	Wollman Jacob 1959
PA 410	F ⁻	thr ⁻ leu ⁻ thi ⁻ arg ⁻ mtl ⁻ xyl ⁻ mal ⁻ Sm ^r his ⁻ try ⁻ lac ⁻ λ^r	-	"
P4x	Hfr	met (λ) ⁺	-	-
H	Hfr	thi (λ) ⁻	-	Hayes 1953
<u>E. coli B</u>				
B	F ⁻	lac ⁻ (X) ⁺	+	Mutant de la souche B type sauvage.
90H	F ⁻	arg ⁻ his ⁻ lac ⁻ (X) ⁺ Sm ^r	+	Maas 1962
609 Sm ^r	F ⁻	his ⁻ try ⁻ (X) ⁺ Sm ^r	-	Mutant Sm ^r obtenu à partir de la souche B609 de de Haan 1954
<u>Hybrides de K12 et de B</u>				
Hfr Hybride	Hfr	prototrophe (X) ⁺	+	Recombinant lac ⁺ du croisement Hfr P4x Blac-(X) ⁺
F ⁻ Hybride	F ⁻	thr ⁻ leu ⁻ arg ⁻ mtl ⁻ xyl ⁻ mal ⁻ Sm ^r his ⁻ try ⁻ (X) ⁻ lac ⁻	-	Recombinant gal ⁺ Sm ^r du croisement Hfr P4x x PA 309

Les symboles utilisés pour désigner les besoins nutritionnels de ces différentes souches sont ceux proposés par Demerec (1963). L'ordre d'injection des différentes souches Hfr est représenté sur la Fig. 13. La restriction de la multiplication du bactériophage P₂ (voir texte) est indiquée par le signe +, l'absence de restriction par le signe -.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,01g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0005g; eau bidistillée, q.s. pour 1.000. Ajusté à pH 7 par KOH. Toutes les dilutions sont faites dans ce milieu dilué au 1/20 en eau bidistillée. (tampon). Ce même milieu est solidifié par addition de 15g de gélose Difco par litre (milieu GS). La gélose molle utilisée pour les étalements est à 7 g de gélose Difco par litre. Le milieu GS est additionné d'une source de carbone (en général de glucose) à une concentration 10/1000 et, si nécessaire, de facteurs de croissance.

Tous les croisements sont faits en milieu liquide (bouillon peptoné). Des cultures des bactéries à croiser, en voie de croissance exponentielle en bouillon, sont mélangées de manière à obtenir une concentration finale de $4 \cdot 10^8$ bactéries F^- et $2 \cdot 10^7$ bactéries Hfr par ml, soit un Hfr pour vingt F^- . Le mélange est agité doucement dans un thermostat à 37° . Après un temps de contact qui varie selon les cas entre une et trois heures, des échantillons sont prélevés, et après dilution en tampon, étalés sur milieu sélectif approprié. Les boîtes de Pétri sont ensuite portées à l'étuve à 37° et les recombinants dénombrés après 48 heures. La sélection des recombinants est généralement réalisée par étalement sur milieu synthétique gélosé additionné des facteurs de croissance nécessaires et de streptomycine ($150 \mu\text{g/ml}$). Celle-ci a pour effet de contre-sélectionner les bactéries donatrices qui lui sont sensibles (alors que les bactéries réceptrices lui sont résistantes). Les bactéries réceptrices sont elles mêmes incapables de se développer sur le milieu de sélection, dont on a omis certains des facteurs de croissance qui leur sont nécessaires.

Les résultats d'un croisement sont évalués en rapportant le nombre de recombinaants obtenus dans une sélection donnée, au nombre de bactéries du type parental minoritaire (c'est-à-dire en général les bactéries Hfr), mis en jeu au début du croisement. La fréquence des recombinaants formés dans une sélection donnée, correspond donc au rapport "nombre de recombinaants pour cent bactéries initiales du type minoritaire".

Les recombinaants obtenus sont réisolés sur le même milieu que celui qui a servi à leur sélection, puis analysés pour les caractères génétiques qui distinguent les bactéries donatrices et réceptrices. Pour une sélection donnée on analyse ainsi de 100 à 200 recombinaants. On appelle constitution génétique des recombinaants la fréquence pour laquelle les différents caractères non sélectionnés des bactéries Hfr se retrouvent parmi cent recombinaants formés dans une sélection donnée.

Dans un croisement entre bactéries Hfr d'un type particulier et bactéries F^- , les différents caractères génétiques des bactéries Hfr sont transmis à des recombinaants avec des fréquences différentes. Pour un type de Hfr donné, on peut ainsi déterminer un gradient de fréquence de transmission des caractères génétiques qui exprime le gradient de transfert chromosomique de cet Hfr particulier. Les marqueurs génétiques transmis à la fréquence la plus élevée sont appelés marqueurs proximaux. Ceux qui sont transmis à la fréquence la plus basse sont appelés marqueurs distaux. Le gradient de transmission des caractères génétiques est également reflété par la constitution génétique des recombinaants, lorsque le caractère génétique sélectionné est proximal aux marqueurs génétiques non sélectionnés.

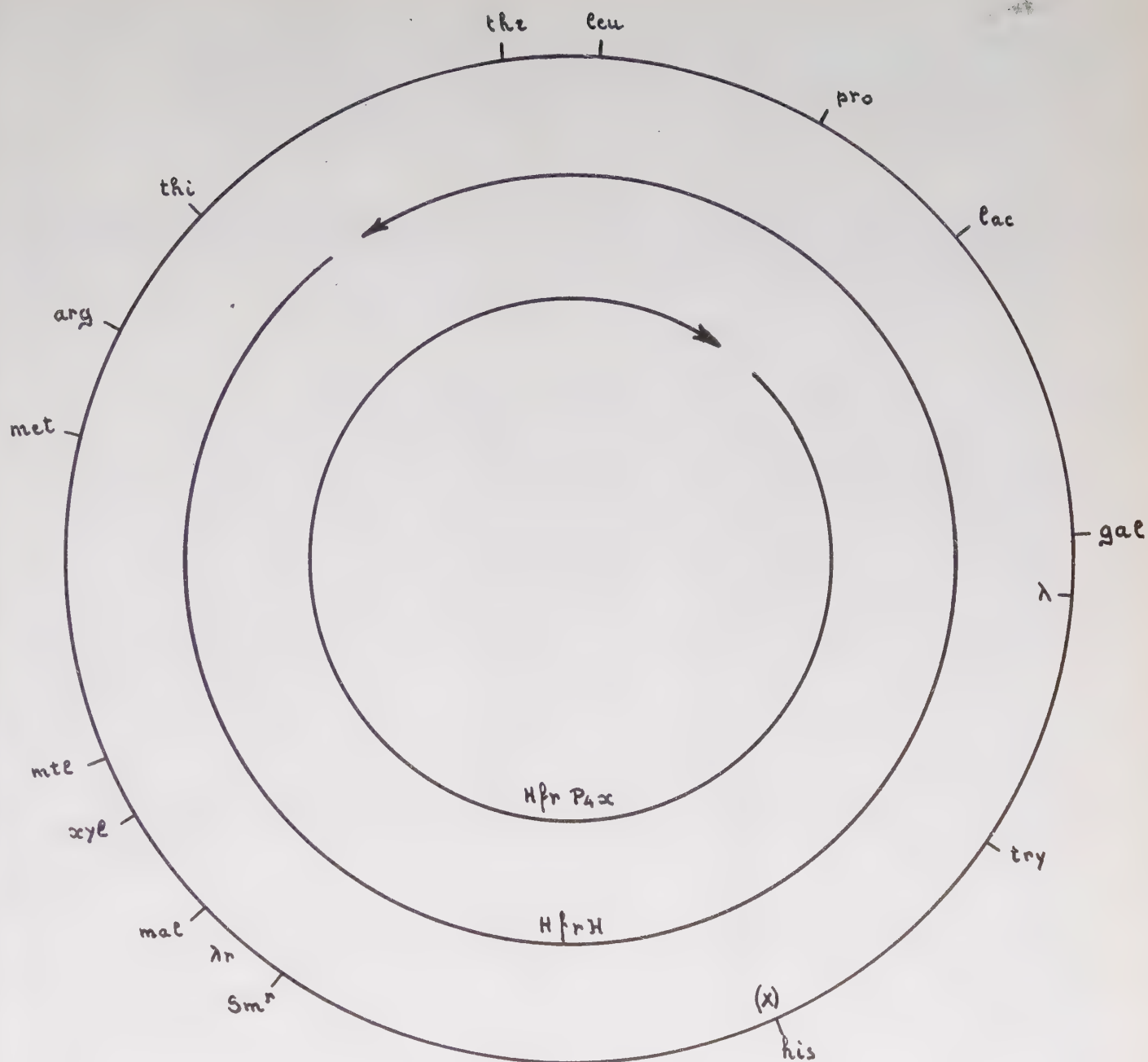


Figure 13

Groupe de liaison d'*E. coli* K12

Sur le cercle extérieur sont disposés les différents caractères génétiques examinés. Les cercles intérieurs représentent la direction dans laquelle ces différents gènes sont transmis par les deux types de souches K12 utilisées. La pointe de la flèche correspond à l'origine du chromosome injecté. La souche *Hfr Hybride* a le même ordre d'injection que la souche *Hfr P4x*.

L'analyse génétique des recombinants permet donc de déterminer le degré de liaison entre un marqueur non sélectionné et un caractère sélectionné.

CROISEMENTS ENTRE BACTERIES DONATRICES (X)⁺ ET BACTERIES RECEPTRICES (X)⁻

Pour étudier la localisation génétique du prophage X, il était nécessaire, ainsi qu'il a été indiqué ci-dessus, d'avoir recours à des croisements entre bactéries E. coli K12 et bactéries E. coli B. En l'absence de souches d'E. coli B convenablement marquées il a été tenté, dans un premier temps d'obtenir un recombinant Hfr, porteur du prophage X, dans un croisement entre bactéries K12 Hfr et B.F⁻.

Isolement d'une souche Hfr (X)⁺ Hybride d'E. coli K12 et d'E. coli B.

On sait que dans un croisement entre bactéries Hfr et bactéries F⁻, le caractère Hfr des bactéries donatrices est le caractère le plus distal de leur groupe de liaison (Hayes 1953 b Wollman et Jacob 1958). Dans l'ignorance où nous nous trouvons de la localisation du prophage X, notre choix s'est donc porté sur une souche d'E. coli B lac⁻ prototrophe et sur une souche K12 Hfr dont on sait que le facteur sexuel est situé au voisinage du gène lactose, la souche F4x (tableau VII).

Le croisement a été réalisé dans les conditions habituelles, avec un excès de bactéries Hfr. Après trois heures de contact, des échantillons ont été étalés sur milieu synthétique lactosé. On sélectionne ainsi des recombinants $\text{lac}^+ \text{met}^+$, ayant hérité le caractère lac^+ des bactéries donatrices et le caractère met^+ (méthionine) des bactéries réceptrices. Les recombinants sont apparus avec une fréquence d'environ 10^{-4} . Cent quarante d'entre eux ont été réisolés et analysés d'une part quant à la présence du prophage X, d'autre part quant à leur caractère "donateur". Parmi ces recombinants, 129 étaient immuns au phage P_2 Hybride (c'est-à-dire étaient X^+) alors que 11 lui étaient sensibles (c'est-à-dire étaient X^-). Le fait que le prophage X, porté par les bactéries F^- ségrège dans ce croisement, constitue une forte présomption en faveur de sa localisation chromosomique.

Le caractère donateur de ces recombinants a été recherché par répliques sur des bactéries K12 $\text{F}^- \text{thr leu}$ et Sm^r afin d'obtenir des recombinants $\text{thr}^+ \text{leu}^+ \text{Sm}^r$. Si par cette méthode, cinq des recombinants se sont montrés fertiles, un seul d'entre eux avait les propriétés d'une souche Hfr lorsque l'épreuve fut réalisée en milieu liquide. Les caractères de cette souche ont été étudiés : elle est prototrophe et possède le prophage X. Elle a donc hérité du parent K12 Hfr les caractères lac^+ et Hfr mais non le prophage λ . Du parent B, elle possède le prophage X, le caractère met^+ et vraisemblablement la région galactose où est localisé le prophage λ . Etant donné que la souche réceptrice est la souche B, on peut présumer que la plus grande partie du génome de cet Hybride provient de la souche B.

Croisement entre la souche Hfr(X)⁺Hybride et une souche Kl2 F⁻ :
Isolement d'un recombinant F⁻(X)⁺Hybride.

Le croisement précédent entre bactéries Kl2 Hfr (X)⁺ et bactéries B (X)⁺ nous a permis d'une part d'établir que le caractère X ségrégeait parmi les recombinants et d'autre part d'isoler un recombinant Hfr (X)⁺ Hybride. Il devenait donc possible de réaliser un croisement entre la souche Hfr (X)⁺ Hybride et une souche Kl2 F⁻ convenablement marquée, afin d'obtenir des renseignements sur la localisation approximative du prophage X. La souche réceptrice utilisée est la souche Kl2 F⁻PA 309Sm^r (tableau VII) qui est auxotrophe pour les caractères thr, leu, try, his, arg, thi et qui possède en outre plusieurs marqueurs de fermentation (lac⁻, gal⁻, mal⁻, xyl⁻, mtl⁻). Le croisement est réalisé dans les conditions habituelles, mais après deux heures de contact, le mélange est dilué au demi avec précaution, par addition du même volume de bouillon et maintenu encore trois heures à 37° afin de permettre la pénétration et l'expression des marqueurs distaux des bactéries Hfr. On sélectionne alors les recombinants ayant reçu des bactéries Hfr les caractères thr⁺, leu⁺, arg⁺, his⁺, try⁺ et gal⁺. Ces différents types de recombinants sont dénombrés, réisolés et analysés. Les résultats sont rapportés sur le tableau VIII, où figurent les fréquences des divers types de recombinants. Dans cette expérience, la fréquence des recombinants thr⁺ leu⁺ Sm^r était de 5%.

La première observation qui mérite d'être faite c'est que le prophage X ségrége parmi les recombinants, ainsi qu'il avait déjà été constaté dans le croisement réciproque. Mais, fait beaucoup plus remarquable, il sé-

TABLEAU VIII

Croisement entre bactéries Hfr Hybride (X)⁺ et bactéries F⁻ K12 (X)⁻.

Croisement	Recom- binants	Fréquence des recom- binants	Constitution génétique										
			thr ⁺ leu ⁺	arg ⁺	mtl ⁺	xyl ⁺	mal ⁺	(X) ⁺	his ⁺	try ⁺	gal ⁺	lac ⁺	
Hfr Hybride (X) ⁺ x K12 F ⁻ PA 309(X) ⁻	thr ⁺ leu ⁺ Sm ^r	5	100	18	2	1	1	0	0	0	0	0	
	arg ⁺ Sm ^r	2	5	100	11	12	3	0	0	0	0	0	
	his ⁺ Sm ^r	0,02	0	3	0	2	2	69	100	0	0	0	
	try ⁺ Sm ^r	0,01	1	4	3	2	1	3	3	100	4	2	
	gal ⁺ Sm ^r	0,0008	2	4	5	5	2	2	1	4	100	8	

Les recombinants thr⁺leu⁺Sm^r, arg⁺Sm^r, his⁺Sm^r, try⁺Sm^r et gal⁺Sm^r ont été sélectionnés. Leurs fréquences sont exprimées en % du nombre initial des Hfr. Cent recombinants de chaque type ont été analysés quant à leur constitution génétique.

grège en étroite liaison avec le caractère histidine. C'est ainsi que plus de 70% des recombinants his^+Sm^r ont également reçu le prophage X des bactéries Hfr et que deux sur trois des recombinants try^+Sm^r qui sont X^+ sont également his^+ .

On observe également que, contrairement à ce qui se passe dans un croisement entre bactéries Kl2 Hfr et bactéries Kl2 F^- , les recombinants obtenus dans les différentes sélections ont hérité de très peu de caractères des bactéries donatrices. Nous reviendrons sur ce point ultérieurement.

Parmi les deux recombinants gal^+Sm^r ayant hérité du prophage X, il se trouvait que l'un d'entre eux possédait encore la plupart des marqueurs de la souche réceptrice, en particulier les marqueurs his et try . Ce recombinant F^- dont le génome est pour sa plus grande part celui d'E. coli Kl2, mais qui est porteur du prophage X, a été conservé et sera appelé souche F^- Hybride $(X)^+$ (tableau VII).

CROISEMENTS ENTRE BACTERIES DONATRICES $(X)^-$ ET BACTERIES RECEPTRICES $(X)^+$.

Le croisement précédent a montré que le prophage X était transmis à des recombinants en étroite liaison avec le caractère his^+ des bactéries donatrices. Nous avons tenté de vérifier cette liaison par une série de croisements réciproques mettant en jeu des bactéries donatrices Kl2 Hfr $(X)^-$ et des bactéries réceptrices portant le prophage X, qu'il s'agît de souches d'E. coli B ou de la souche F^- Hybride qui vient d'être décrite (tableau VII).

Croisements entre bactéries Kl2 Hfr P4x (X)⁻ et bactéries F⁻
(X)⁺

Les résultats de plusieurs croisements de ce type sont rapportés dans le tableau IX.

On voit que dans ces divers croisements le caractère non lysogène (X)⁻ des bactéries Hfr est dans tous les cas transmis aux recombinants en étroite association avec le caractère his⁺ des bactéries donatrices, ce qui confirme sa localisation chromosomique au voisinage de ce gène. On notera également que si la fréquence des recombinants est sensiblement la même dans des croisements mettant en oeuvre des bactéries réceptrices F⁻Kl2, F⁻Hybride et F⁻B609, elle semble plus basse dans le croisement où la souche réceptrice est la souche B 90H. On voit également que si le croisement entre les bactéries Hfr Kl2 et F⁻Hybride, la constitution génétique des recombinants n'est pas très différente de ce qu'elle est dans un croisement entre bactéries de la souche Kl2, les recombinants obtenus dans les croisements entre bactéries Kl2 Hfr et B F⁻ héritent de très peu de caractères des bactéries Hfr donatrices. Si l'on compare les deux premiers croisements du tableau IX, on constate que dans le premier d'entre eux 16% des recombinants his⁺Sm^r ont hérité du marqueur proximal arg⁺ et 20 % du marqueur met⁻, alors que dans le second croisement 2 % des recombinants his⁺ possèdent le marqueur arg⁺ et 1 % le marqueur met⁻. Ces observations sont à rapprocher des résultats déjà signalés à propos du croisement entre la souche Hfr Hybride et une souche F⁻Kl2. Le fait que la liaison entre le caractère histidine et le prophage X soit aussi apparente dans tous les croisements réalisés n'en prend que plus de valeur. On peut en conclure

TABLEAU IX

Croisements entre bactéries Kl2 Hfr P4x(X)⁻ et bactéries F⁻(X)⁺

Croisements de la sou- che Kl2 Hfr P4x par	Recombinants	Fréquence des recombinants	Constitution génétique										
			thr ⁺ leu ⁺	arg ⁺	met	mtl ⁺	xyl ⁺	mal ⁺	(X) ⁻	his ⁺	try ⁺	lac ⁺	
(1) F ⁻ Hybride Sm ^r	thr ⁺ leu ⁺ Sm ^r	20	100	23	21	3	3	1	1	2	2	4	
	arg ⁺ Sm ^r	7,4	34	100	91	14	13	6	1	1	3	3	
	his ⁺ Sm ^r	0,15	22	16	20	11	7	7	74	100	16	0	
	try ⁺ Sm ^r	0,11	28	18	12	8	9	6	24	23	100	5	
(2) B 90HSm ^r (arg his)	arg ⁺ Sm ^r	1,6	-	100	16	-	-	-	1	1	-	0	
	his ⁺ Sm ^r	0,04	-	2	1	-	-	-	84	100	-	0	
(3) B 609Sm ^r (his try)	his ⁺ Sm ^r	0,3	-	-	12	•	-	-	88	100	0	-	
	try ⁺ Sm ^r	0,06	-	-	2	-	-	-	3	4	100	-	

Les divers types de recombinants indiqués ont été sélectionnés. Leurs fréquences sont exprimées en % du nombre initial des Hfr. Dans un croisement témoin entre Hfr P4x et une souche Kl2 F⁻, PA 410 Sm^r, la fréquence des divers types de recombinants était :

thr⁺leu⁺Sm^r 15 % , arg⁺Sm^r 4 % , his⁺Sm^r 0,14 % , et try⁺Sm^r 0,076 %.

que le prophage X est étroitement lié aux gènes qui gouvernent la biosynthèse de l'histidine.

Croisements entre bactéries Kl2 Hfr H (X)⁻ et bactéries F⁻(X)⁺.

Les croisements rapportés jusqu'ici ont montré que le prophage X était localisé sur le chromosome des bactéries Hfr et F⁻ utilisées, qu'il s'agit de souches E. coli B ou de souches Hybride entre E. coli B et E. coli Kl2 proches d'E. coli B (souche Hfr Hybride) ou d'E. coli Kl2 (souche F⁻Hybride). Cependant, chez la souche Hfr P4x utilisée qui transmet ses caractères dans l'ordre indiqué sur la figure 13, le caractère his⁺ est relativement distal, et surtout, il est transmis postérieurement au caractère streptomycine utilisé pour contre sélectionner les bactéries donatrices. Aussi ces croisements ont-ils été répétés en utilisant le dérivé non lysogène de la souche Hfr de Hayes (souche Hfr H (λ)⁻ tableau VII) qui transfère ses caractères génétiques dans l'ordre indiqué sur la figure 13.

Les résultats de deux croisements de ce type sont rapportés sur la tableau X, où l'on voit que le caractère (X)⁻ des bactéries donatrices est transmis en étroite liaison avec le caractère his⁺.

Les recombinants his⁺Sm^r isolés dans le croisement (1) du tableau X, ont été analysés quant aux caractères try⁺ et X⁻ du type parental Hfr. Si en effet le caractère X⁻ se trouve situé entre les caractères his⁺ et try⁺, on pourrait s'attendre à trouver plus de recombinants his⁺try. Les résultats de cette analyse sont

TABLEAU X

Croisements entre bactéries Kl2 Hfr H(X)⁻ et bactéries F⁻(X)⁺.

Croisement de la souche Hfr H(X) ⁻ par	Recombinants	Fréquence des recombinants	Constitution génétique					
			thr+ leu+	lac+	gal+	try+	his+	(X) ⁻
(1) F ⁻ hybrideSm ^r	try+Sm ^r	6	34	13	-	100	2	1
	his+Sm ^r	3	27	13	-	41	100	64
(2) B 609Sm ^r (his try)	try+Sm ^r	4,7	-	-	-	100	1	8
	his+Sm ^r	0,75	-	-	-	12	100	75
(3) Kl2 PA 309Sm ^r	thr+leu+Sm ^r	-	100	58	45	35	14	-
	gal+Sm ^r	-	62	63	100	52	19	-
	try+Sm ^r	3,75	56	59	64	100	20	-
	his+Sm ^r	1	45	47	49	57	100	-

Les divers types de recombinants indiqués ont été sélectionnés. Leurs fréquences sont exprimées en % du nombre initial des Hfr. Un croisement témoin entre Hfr H et une souche Kl2 F⁻ a été analysé de la même manière que les croisements hétérologues entre la souche Kl2 Hfr H et les souches F⁻, soit de type B, soit de type hybride.

TABLEAU XI

Analyse de la transmission du caractère X aux recombinants his^+Sm^r

Croisement HfrH x F ⁻ Hybride				Croisement HfrH x B 609 Sm ^r			
Recombinants		Caractère (X) ⁻		Recombinants		Caractère (X) ⁻	
Type	Nombre	Nombre	%	Type	Nombre	Nombre	%
$his^+try^+sm^r$	41	27	66	$his^+try^+Sm^r$	25	19	76
$his^+try^+Sm^r$	59	37	63	$his^+try^+Sm^r$	172	131	76

100 recombinants his^+Sm^r dans le croisement HfrH x F⁻ Hybride et 197 recombinants his^+Sm^r dans le croisement HfrH x B 609 Sm^r ont été examinés quant aux caractères try^+ et X⁻ des bactéries Hfr.

rapportés dans le tableau XI, où l'on voit que le caractère X^- apparaît en proportions sensiblement égales parmi les deux types de recombinants. Ce fait indiquerait que le prophage X est situé vraisemblablement au delà du caractère his^+ par rapport au caractère try^+ . Des expériences sont en cours pour vérifier ce point.

°

° °

L'ensemble des résultats rapportés dans ce chapitre montre donc que l'unité douée de continuité génétique présente dans les bactéries *E. coli* B et que nous avons appelé prophage X a une localisation chromosomique. Le prophage X, et le site correspondant X^- des bactéries dépourvues de ce prophage, sont situés dans le voisinage immédiat du locus histidine, que l'on ait affaire à des souches d'*E. coli* B, d'*E. coli* K12 ou à des souches hybrides entre *E. coli* K12 et *E. coli* B. Ces résultats peuvent être rapprochés des résultats obtenus simultanément aux nôtres par Kelly et publiés depuis (1963) concernant le prophage P_2 . Cet auteur a montré par des croisements mettant en oeuvre des souches d'*E. coli* C et d'*E. coli* K12, que chez *E. coli* K12 le prophage P_2 pouvait indifféremment occuper un site proche du gène histidine et un site proche du gène méthionine; alors que chez *E. coli* C, P_2 occupe préférentiellement le site histidine et accessoirement le site méthionine, en particulier lorsque le site histidine est déjà occupé par un prophage P_2 ; toute-

fois, les sites voisins du gène histidine occupés par P_2 chez *E. coli* K12 et *E. coli* C, se seraient pas alléliques,

L'examen des tableaux VIII, IX et X met en évidence un autre fait intéressant. Dans les croisements entre bactéries K12 Hfr et K12 F^- , (croisements homologues) une proportion élevée des recombinants sélectionnés pour un caractère distal des bactéries donatrices possède les marqueurs proximaux de ces bactéries. Cette proportion est en général voisine de 50 %. Lorsque le caractère sélectionné est proximal, les marqueurs distaux des bactéries donatrices apparaissent dans des proportions décroissantes selon leur degré de liaison au caractère sélectionné (voir Wollman et Jacob 1959). Un exemple en est fourni par le croisement (3) du tableau X.

Les résultats sont sensiblement différents dans les croisements hétérologues entre souches d'*E. coli* K12 et d'*E. coli* B ou entre souches Hybride et souches d'*E. coli* B d'une part, souches *E. coli* K12 d'autre part. Dans tous ces croisements, il apparaît que les recombinants sélectionnés possèdent beaucoup moins de caractères génétiques des bactéries donatrices que les mêmes recombinants obtenus dans un croisement homologue K 12 Hfr x K12 F^- . Dans un croisement hétérologue, un recombinant donné ne possède qu'un court segment de matériel génétique provenant des bactéries donatrices, c'est-à-dire que les liaisons génétiques qui existaient sur le chromosome de la bactérie donatrice se trouvent considérablement distendues. En particulier, le gradient de transmission des caractères génétiques, tel qu'il apparaît à l'examen de la constitution génétique des recombinants sélectionnés est très prononcé, beaucoup plus prononcé même que le gradient établi

par examen des fréquences des recombinants obtenus dans différentes sélections. On doit en conclure que si la probabilité de transfert et la probabilité d'intégration de différents caractères génétiques varient assez peu, par contre la probabilité d'intégration simultanée de deux caractères génétiques des bactéries donatrices est beaucoup plus faible dans les croisements hétérologues que dans les croisements homologues. Les résultats sont qualitativement les mêmes que ceux qu'on obtient en comparant des croisements mettant en oeuvre des bactéries K12 Hfr irradiées par la lumière ultra-violette et des croisements témoins (Wollman et Jacob 1959). Dans les deux cas, seuls de courts segments génétiques des bactéries Hfr sont intégrés.

L'interprétation la plus vraisemblable de ces faits est la suivante. Quoique les cartes génétiques des bactéries *E. coli* K12 et *E. coli* B soient très probablement assez semblables, les chromosomes des deux souches ne sont pas cependant rigoureusement homologues. Soit par suite de différences structurales, soit par suite de défauts d'appariement, seuls de petits segments de matériel génétique des bactéries donatrices peuvent être intégrés. Ces résultats sont à rapprocher des résultats obtenus dans les recombinaisons interspécifiques entre *E. coli* et *Shigella*, par exemple (Luria et Burrous 1957), entre *E. coli* et *Salmonella* et entre différentes souches de *Salmonella* (Falkow, Rownd et Baron 1962). Ce type d'interprétation a déjà été avancé pour rendre compte des faibles fréquences de recombinaison observées dans les transformations interspécifiques chez les hémophiles lorsqu'on compare des transformations intraspécifiques et interspécifiques

(Schaeffer et Ritz 1955 - Schaeffer 1958).

L'examen des différents croisements hétérologues en dépit du nombre relativement faible de caractères génétiques dont nous disposons, fait cependant apparaître certaines différences. C'est ainsi que le croisement du tableau VIII entre bactéries Hfr Hybride et bactéries Kl2 F⁻, a les caractères d'un croisement hétérologue en ce qui concerne la constitution génétique des recombinants, alors que les croisements des tableaux IX et X entre bactéries Kl2 Hfr et bactéries F⁻ Hybride se rapprochent davantage des croisements homologues entre bactéries Kl2 Hfr et Kl2 F⁻. Ceci illustre le fait que la souche Hfr Hybride possède essentiellement le génome des bactéries B réceptrices dont elle est issue, alors que la souche F⁻ Hybride possède la majorité des caractères génétiques de la souche Kl2 F⁻ qui lui a donné naissance.

Lorsqu'on considère les résultats de croisements entre bactéries des souches B et Kl2 d'E. coli, un phénomène dont il faut tenir compte est le phénomène de variation conditionnée par l'hôte décrit au début de ce travail (page 10). Des bactériophages P₂, issus d'E. coli Kl2 n'ont qu'une faible efficacité d'étalement sur E. coli B, alors que des bactériophages P₂ issus d'E. coli B forment autant de plages sur E. coli Kl2 que sur E. coli B. La souche Kl2 d'E. coli se comporte donc vis à vis du bactériophage P₂ comme la souche de Sh dysenteriae. Le phénomène de variation conditionnée par l'hôte est donc un caractère qui permet de distinguer les souches d'E. coli Kl2 et B. Nous avons étudié à cet égard les différentes souches mises en oeuvre dans les croisements en utilisant comme

test le bactériophage P_2 . Les résultats de ces essais sont résumés dans le tableau VII. On voit que les différentes souches d'E. coli B (à l'exception de la souche 609 de de Haan) donnent la variation conditionnée par l'hôte, ainsi que la souche Hfr Hybride, ce qui confirme son étroite parenté avec la souche E. coli B dont elle provient. Au contraire, les différentes souches d'E. coli K12, ainsi que la souche F⁻Hybride ne donnent pas ce phénomène, ce qui confirme la parenté de la souche F⁻Hybride avec la souche d'E. coli K12 dont elle provient. La souche d'E. coli B 609 de de Haan, obtenue par lui en deux étapes mutationnelles (1954) constitue une exception intéressante. Cette souche a en effet perdu la propriété de restreindre la multiplication du bactériophage P_2 et de modifier phénotypiquement ce bactériophage.

Dans le cas où la restriction du développement d'un bactériophage et la variation conditionnée par l'hôte sont sous la dépendance du prophage P_1 (voir page 37) la nature de ce phénomène a été récemment analysée (Arber et Dussoix 1962 et Dussoix et Arber 1962). Ces auteurs ont pu démontrer que l'ADN qui pénètre dans une bactérie porteuse du prophage P_1 est dégradé et que dans le cas d'un bactériophage tel que λ , seuls survivent et se multiplient les bactériophages dont l'ADN a été spécifiquement modifié avant d'être dégradé. Un tel ADN est désormais protégé lorsqu'il est à nouveau introduit dans une bactérie lysogène pour P_1 . Un tel phénomène pourrait intervenir dans les croisements entre E. coli B et E. coli K12. On devrait cependant s'attendre, dans ce cas à ce que la fréquence des recombinants soit considérablement inférieure à ce qu'elle est dans un croisement ho-

mologue entre bactéries E. coli K12. Si l'on compare les résultats des croisements du tableau IX, on constate que la fréquence des recombinants dans le croisement entre bactéries K12 Hfr et bactéries F^- B 90H est environ 5 fois moindre que dans les croisements entre les mêmes bactéries K12 Hfr et des bactéries F^- K12, Hybrides ou B 609 de de Haan qui ne présentent pas de modification conditionnée par l'hôte. En comparant les résultats des croisements entre les bactéries K12 Hfr et les souches B F^- 90H ou 609, on constate cependant que dans les deux cas les caractères non sélectionnés des bactéries Hfr apparaissent parmi les recombinants avec des fréquences beaucoup plus faibles que dans des croisements mettant en oeuvre des bactéries réceptrices F^- K12 ou Hybrides. Si la variation conditionnée par l'hôte pourrait intervenir dans une certaine mesure, elle ne permet cependant pas à elle seule de rendre compte des différences observées entre les résultats des croisements entre souches homologues et souches hétérologues. Une étude plus précise de ces phénomènes est en cours.

RESUME ET CONCLUSIONS.

I.- Le phénomène qui est à l'origine de ce travail est l'apparition, dans un lysat du bactériophage P_2 , d'un bactériophage capable de conférer une immunité différente de celle conférée par le bactériophage P_2 dont il provient.

Le bactériophage P_2 , originellement issu de la souche lysogène *E. coli* Lisbonne, est actif sur différentes souches d'*E. coli* ou de *Sh dysenteriae*. Lorsque des bactériophages P_2 formant des plages claires sont entretenues sur *Sh dysenteriae* et qu'un tel stock est utilisé pour infecter des bactéries *E. coli* B, on observe l'apparition, parmi les phages produits, d'une faible proportion (10^{-3} à 10^{-4}) de phages formant des plages troubles. Ces phages exceptionnels forment des plages sur *Sh dysenteriae* et sur *Sh dysenteriae* lysogène pour P_2 mais ne forment pas de plage sur *E. coli* B. Inversement, des bactéries *Sh dysenteriae* lysogènes pour ce nouveau type de phage sont immunes envers celui-ci, mais sont sensibles au phage P_2 originel. Ce nouveau type de phage (P_2 Hybride) confère donc une immunité spécifique différente de celle qui est conférée par le phage P_2 . Lorsque ce phénomène fut observé, on crut avoir affaire au premier exemple d'une mutation affectant l'immunité conférée par un bactériophage tempéré.

II.- Les propriétés des bactériophages P_2 et P_2 Hybride ont été comparées (spécificité immunologique, sensibilité à la lumière ultra violette, cycle de multiplication).

S'il existe une parenté incontestable entre les deux types de phages, le fait qu'ils diffèrent par l'immunité qu'ils confèrent et surtout les circonstances dans lesquelles apparaît le phage P_2 Hybride, ne permettent pas de considérer ce phage comme un mutant du bactériophage P_2 . En effet le phage P_2 Hybride n'apparaît jamais lorsque le bactériophage P_2 se reproduit dans les souches *Sh dysenteriae*, *E. coli* K12 ou *E. coli* C alors qu'il apparaît toujours et dans des proportions constantes, lorsque le bactériophage P_2 se reproduit chez *E. coli* B. Or la souche B est immune au phage P_2 Hybride et ce phage confère à *Sh dysenteriae* une immunité spécifique identique à celle que possède naturellement la souche *E. coli* B. L'hypothèse est donc émise que la souche *E. coli* B est lysogène pour un prophage inconnu, le prophage X, et que le phage P_2 Hybride est le produit d'une recombinaison génétique entre le prophage X et le bactériophage P_2 , lors de la multiplication de celui-ci dans *E. coli* B.

III.- Cette hypothèse a été vérifiée par l'isolement à partir de la souche B type sauvage $B(X)^+$ de dérivés $B(X)^-$ qui sont sensibles au bactériophage P_2 Hybride et qui, infectés par le bactériophage P_2 , ne donnent plus naissance à des bactériophages de type P_2 Hybride. De telles souches $B(X)^-$ ont été isolées par les différentes méthodes utilisées pour guérir des bactéries lysogènes ; irradiation par la lumière ultra-violette ou infection par le bactériophage apparenté P_2 . La conclusion que la souche B d'*E. coli* est lysogène était d'autant plus remarquable que cette souche est utilisée depuis de nombreuses années dans de nombreux laboratoires pour l'étude des bactériophages.

Cependant, toutes les tentatives faites pour mettre en évidence des bactériophages correspondant au prophage X sont restées infructueuses. Force est donc de conclure que la souche B d'E. coli est une souche lysogène défective qui, en aucune circonstance, ne produit de particules infectieuses correspondant au prophage X. On comprend ainsi que son caractère lysogène ait été aussi longtemps méconnu.

IV.-- L'existence des souches $B(X)^+$ et $B(X)^-$ a permis de comparer les propriétés de ces souches et de rechercher si des caractères phénotypiques de la souche E. coli B se trouvaient être sous la dépendance du prophage X. Un certain nombre de dérivés de la souche E. coli B qui diffèrent du type sauvage par une variété de caractères ont été également examinés à cet égard. Aucune de ces propriétés ne s'est révélée dépendre de la présence ou de l'absence du prophage X.

L'analyse du caractère défectif du prophage X a été également entreprise. L'infection de bactéries $B(X)^+$ par des bactériophages P_2 ne peut suppléer les fonctions défectives du prophage X. Les bactéries $B(X)^+$ ne restaurent pas non plus de manière significative des bactériophages P_2 inactivés par la lumière ultra-violette. Enfin l'infection de bactéries $B(X)^+$ par des bactériophages P_2 génétiquement marqués et l'analyse des bactériophages P_2 Hybride produits montrent que pour la plupart des marqueurs étudiés, il n'existe pas de région allélique correspondante dans le prophage X. Il est donc conclu que le défaut du prophage X est un défaut important, tel que celui qui résulterait d'une délétion d'une partie appréciable de son matériel génétique. Tout se passe comme si le prophage X était réduit essentiellement à la région

portant les déterminants de l'immunité et du pouvoir lysogénisant.

V.- L'existence dans les bactéries $B(X)^+$ d'une structure matérielle spécifique, le prophage X, reçoit une confirmation dans les résultats d'expériences de centrifugation à l'équilibre en gradient de densité. Les densités de bactériophages P_2 et P_2 Hybride ont été comparées. Dans tous les cas, les bactériophages P_2 Hybride se sont révélés légèrement mais significativement plus denses que les bactériophages P_2 . L'interprétation de ces résultats est que la recombinaison entre le bactériophage P_2 et le prophage X n'est pas rigoureusement équationnelle : le segment hérité du prophage X par le phage P_2 Hybride serait sensiblement plus important que le segment correspondant du bactériophage P_2 .

Les bactériophages P_2 Hybride formés au cours d'un cycle de multiplication du bactériophage P_2 dans les bactéries $B(X)^+$ proviennent, dans leur immense majorité, d'évènements recombinaison indépendants. Ces bactériophages, cependant, ne présentent aucune hétérogénéité quant à leur densité. Ceci conduirait à conclure que chez les phages P_2 Hybride le segment génétique du bactériophage P_2 qui est remplacé, aussi bien que le segment génétique du prophage X par lequel il est remplacé, sont rigoureusement définis.

VI.- L'ensemble de ces expériences permet donc de conclure que non seulement la souche B d'E. coli est une souche lysogène défective, mais que le prophage qu'elle porte est vraisemblablement réduit à un segment relativement court de son matériel génétique, segment qui porte les déterminants de l'immunité et du pouvoir lysogénisant. La localisation génétique de ce prophage a été étudiée par des

croisements entre bactéries des souches E. coli K12 et E. coli B(X)⁺. Des souches Hybride entre E. coli K12 et E. coli B et portant le prophage X ont ainsi été isolées. Des croisements réciproques ont donc pu être réalisés entre bactéries Hfr(X)⁺ et bactéries F⁻(X)⁻ d'une part, et entre bactéries Hfr(X)⁻ et bactéries F⁻(X)⁺ d'autre part. Dans les deux types de croisement, il a été observé que le caractère X ségrège parmi les recombinants et qu'il est étroitement lié aux déterminants génétiques de la biosynthèse de l'histidine.

On peut donc conclure que l'unité génétique présente dans les bactéries B(X)⁺ est localisée sur le chromosome et qu'elle y occupe une position définie.

Les résultats des croisements mettant en oeuvre des bactéries E. coli B, E. coli K12 et des hybrides de ces deux souches indiquent que les groupes de liaison des souches K12 et B d'E. coli sont vraisemblablement très comparables. Les fréquences de recombinaison observées sont également assez semblables. Cependant dans les croisements entre E. coli K12 et E. coli B (croisements hétérologues) les liaisons génétiques sont beaucoup moins apparentes que dans les croisements entre souches d'E. coli K12 (croisements homologues). Il semble donc exister entre les deux types de bactéries des différences de structure du matériel génétique. Le fait que dans des croisements hétérologues, seuls des segments relativement courts du matériel génétique des bactéries donatrices sont intégrés, s'expliquerait par de telles différences de structure.

B I B L I O G R A P H I E

- ADAMS, M.H. (1959) Bacteriophages. Interscience Publi. Inc., New York.
- APPLEYARD, R.K. (1956) The transfer of defective lambda lysogeny between strains of Escherichia coli. J. Gen. Microb., 14, 573-582.
- ARBER, W., et DUSSOIX, D. (1962) Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. I. Host controlled modification of bacteriophage λ . J. Mol. Biol., 5, 18-36.
- ARBER, W., et KELLENBERGER, G. (1958) Study of the properties of seven defective lysogenic strains derived from Escherichia coli K12 (λ). Virology, 5, 458-475.
- ARBER, W., KELLENBERGER, G., et WEIGLE, J.J. (1957) La défec-tuosité du phage lambda transducteur. Schweitz z. Path. Bakt., 20, 659-665.
- ARBER, W., et LATASTE-DOROLLE, C. (1961) Erweiterung des Wirts-bereiches des Bakteriophagen λ auf Escherichia coli B. Path. Microb., 24, 1012-1018.
- BENZER, S. (1957) The elementary units of heredity. In "The chemical basis of heredity", W.D. McElroy et H.B. Glass ed., The Johns Hopkins Press, Baltimore, 70-93.
- BERTANI, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. J. Bact., 62, 293-300.

- BERTANI, G. (1953 a) Studies on lysogenesis. III. Superinfection of lysogenic Shigella dysenteriae with temperate mutants of the carried phage. J. Bact., 67, 696.
- BERTANI, G. (1953 b) Infections bactériophagiques secondaires des bactéries lysogènes. Ann. Inst. Pasteur, 84, 273-280.
- BERTANI, G. (1953 c) Prophage dosage and immunity in lysogenic bacteria. Records of the Genetics Society of America, 22, 66.
- BERTANI, G. (1953 d) Lysogenic versus lytic cycle of phage multiplication. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 18, 65.
- BERTANI, G. (1956) The role of phage in bacterial genetics. Brookhaven Symp. in Biol., n°8, 50-57.
- BERTANI, G. (1957) A disimmune mutant of temperate phage P₂. Bacteriol. Proc. (Soc. Amer. Bacteriologists), 38.
- BERTANI, G. (1958) Lysogeny. Adv. Virus Res., 5, 151-194.
- BERTANI, G., et SIX, E. (1958) Inheritance of prophage P₂ in bacterial crosses. Virology, 6, 357-381.
- BERTANI, G., et WEIGLE, J.J. (1953) Host controlled variation in bacterial viruses. J. Bact., 65, 113-121.
- BERTANI, L.E. (1960) Host dependent induction of phage mutants and lysogenisation. Virology, 12, 553-569.
- BEUMER, J., et BEUMER-JOCHMANS, M.P. (1952) Etude des phages produits par le bacille lysogène de Lisbonne et de leurs exigences en calcium. Ann. Inst. Pasteur, 83, 582.
- BORDET, J. (1925) Le problème de l'autolyse microbienne transmissible ou du bactériophage. Ann. Inst. Pasteur, 39, 717.

- BORDET, J., et CIUCA, M. (1920) Exsudats leucocytaires et autolyse microbienne transmissible. C.R. Soc. Biol., 83, 1293.
- BURNET, F.M., KEOGH, E.V., et LUSH, D. (1937) The immunological reactions of the filterable viruses. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 15, 227-368.
- CALEF, E., et CAVALLI-SFORZA, L.L. (1955) Peculiarita degli ibridi fra coli B e K12. Ricerca Scient., 25 (suppl.), 123-127.
- CHRISTENSEN, J.R. (1961) On the process of host controlled modification of bacteriophage. Virology, 13, 40-43.
- CLARKE, N.A. (1952) Studies on the host virus relationship in a lysogenic strain of Bacillus megaterium. II. The growth of Bacillus megaterium in synthetic medium. J. Bact., 63, 187-192.
- COHEN, D. (1959) A variant of phage P_2 originating in Escherichia coli strain B. Virology, 7, 112-125.
- COHEN, D. (1960) Analyse de l'hybridation du phage P_2 et d'un prophage défectif d'Escherichia coli B, par la méthode de centrifugation en gradient de densité. C.R. Acad. Sci., 250, 946-948.
- DELBRÜCK, M. (1946) Bacterial viruses or bacteriophages. Biol. Rev., 21, 30-40.
- DELBRÜCK, M., et LURIA, S.E. (1942) Interference between bacterial viruses upon the same host and the mechanism of virus growth. Arch. Bioch., 1, 111-141.
- DEMEREK, M. (1963) Nomenclature in bacterial genetics. Microb. Genet. Bull., 19, 30-34.

- DOOREN DE JONG, L.E. den (1931) Studien über Bacteriophagie.
I. Ueber Bac. megatherium und den darin anwesenden bakteriophagen. Z. Bakteriол. Parasitenk., I. Abt., orig., 120, 1-15.
- DUSSOIX, D., et ARBER, W. (1962) Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. II. Control over acceptance of DNA from infecting phage λ . J. Mol. Biol., 5, 37-49.
- FALKOW, S., ROWND, R., et BARON, L.S. (1962) Genetic homology between Escherichia coli K12 and Salmonella. J. Bact., 84, 1303-1312.
- FREDERICQ, P. (1953) Transfert génétique des propriétés lyso-gènes chez E. coli. C.R. Soc. Biol., 147, 2046.
- GRATIA, A. (1921) De l'adaptation héréditaire du colibacille à l'autolyse microbienne transmissible. C.R. Soc. Biol., 84, 750.
- HAAN, P.G. de (1954) Genetic recombination in Escherichia coli B. I. The transfer of the F agent to E. coli B. Genetica, 27, 293-300.
- HAYES, W. (1953 a) Observations on a transmissible agent determining sexual differentiation in Bact. coli. J. Gen. Microb., 8, 72-88.
- HAYES, W. (1953 b) The mechanism of genetic recombination in E. coli. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 18, 75-93.
- HERSHEY, A.D. (1957) Bacteriophages as genetic and biochemical systems. Adv. Virus Res., 4, 25-61.
- HILL, R.F. (1958) A radiation sensitive mutant of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta, 30, 636-637.

- JACOB, F. (1954) Les bactéries lysogènes et la notion de provirus. Monographies de l'Institut Pasteur. Masson éd., Paris.
- JACOB, F., FUERST, C.R., et WOLLMAN, E.L. (1957) Recherches sur les bactéries lysogènes défectives. II. Les types physiologiques liés aux mutations du prophage. Ann. Inst. Pasteur, 93, 724-753.
- JACOB, F., LWOFF, A., SIMINOVITCH, L. et WOLLMAN, E.L. (1953) Définitions de quelques termes relatifs à la lysogénie. Ann. Inst. Pasteur, 84, 222-224.
- JACOB, F., et WOLLMAN, E.L. (1953) Induction of phage development in lysogenic bacteria. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 18, 101-120.
- JACOB, F., et WOLLMAN, E.L. (1956) Recherches sur les bactéries lysogènes défectives. I. Déterminisme génétique de la morphogénèse chez un bactériophage tempéré. Ann. Inst. Pasteur, 90, 282-302.
- JACOB, F., et WOLLMAN, E.L. (1957) Genetic aspects of lysogeny. In "The chemical basis of heredity". W.D. McElroy et H.B. Glass éd. The Johns Hopkins Press, Baltimore, 468-498.
- JACOB, F., et WOLLMAN, E.L. (1958 a) Genetic and physical determinations of chromosomal segments in E. coli. In "The biological replication of macromolecules". Symp. Soc. Exp. Biol., 12, 75-92.
- JACOB, F., et WOLLMAN, E.L. (1958 b) Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. C.R. Acad. Sci., 247, 154-156.
- JACOB, F., et WOLLMAN, E.L. (1961) Sexuality and the genetics of bacteria. Academic Press. New York et Londres.

- KALMANSON, G., et BROMFENBRENNER, J. (1939) Studies on the purification of bacteriophage. J. Gen. Physiol., 23, 203.
- KELLENBERGER, G., ZICHICHI, M.L., et WEIGLE, J. (1960) Mutations affecting the density of bacteriophage λ . Nature, 187, 161.
- KELLY, B. (1963) Localization of P₂ prophage in two strains of Escherichia coli. Virology, 19, 32-39.
- LEDERBERG, E.M., et LEDERBERG, J. (1953) Genetic studies of lysogenicity in Escherichia coli. Genetics, 38, 51-64.
- LEDERBERG, J., et TATUM, E.L. (1946 a) Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 11, 113-114.
- LEDERBERG, J., et TATUM, E.L. (1946 b) Gene recombination in E. coli. Nature, 158, 558.
- LEDERBERG, S. (1957) Suppression of the multiplication of heterologous bacteriophages in lysogenic bacteria. Virology, 3, 496-513.
- LISBONNE, M., et CARRERE, L. (1922) Antagonisme microbien et lyse transmissible du bacille de Shiga. C.R. Soc. Biol., 86, 569-670.
- LURIA, S.E. (1953) General virology. John Wiley and Sons Ed., New York.
- LURIA, S.E., et BURROUS, J.W. Hybridization between Escherichia coli and Shigella. J. Bact., 74, 461-476.
- LWOFF, A. (1953) Lysogeny. Bact. Rev., 17, 269-337.
- LWOFF, A., et GUTMANN, A. (1950) Recherches sur un Bacillus megatherium lysogène. Ann. Inst. Pasteur, 78, 711-739.

- LWOFF, A., SIMINOVITCH, L., et KJELDGAARD, N. (1950) Induction de la production de bactériophage chez une bactérie lysogène. Ann. Inst. Pasteur, 79, 815-858.
- MAAS, R., et MAAS, W.K. (1962) Introduction of a gene from Escherichia coli B into Hfr and F⁻ strains of Escherichia coli K12. Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1887-1893.
- MACFALL, E., et STENT, G.S. (1958) Three star mutants of coliphage T₂. J. Gen. Microb., 18, 346.
- MESELSON, M., STAHL, F., et VINOGRAD, J. (1957) Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. Proc. Nat. Acad. Sci., 43, 581-588.
- SCHAEFFER, P. (1958) Interspecific reactions in bacterial transformation. Symp. Soc. Exper. Biol., 12, 60-74.
- SCHAEFFER, P., et RITZ, E. (1935) Transfert interspécifique d'un caractère héréditaire chez des bactéries du genre Hemophilus. C.R. Acad. Sci., 240, 1491-1493.
- STOLP, H. (1957) Die isolierung phagensensiblen Bakterien aus einer lysogenen Kultur von Bac. megaterium. Archiv. Mikrobiol., 26, 55-70.
- WEIGLE, J.J., et BERTANI, G. (1953) Variations des bactériophages conditionnées par les bactéries hôtes. Ann. Inst. Pasteur, 84, 175-180.
- WEIGLE, J., MESELSON, M., et PAIGEN, K. (1959) Density alterations associated with transducing ability in the bacteriophage lambda. J. Mol. Biol., 1, 379.
- WITKIN, E.M. (1947) Genetics of resistance to radiation in Escherichia coli. Genetics, 32, 221-248.

- WOLLMAN, E.L. (1947 a) Relations entre le pouvoir de synthétiser la proline et la résistance au bactériophage chez des mutants d'E. coli. Ann. Inst. Pasteur, 73, 348.
- WOLLMAN, E.L. (1947 b) Essai d'analyse des besoins en tryptophane de mutants d'Escherichia coli résistants au bactériophage. Ann. Inst. Pasteur, 73, 1082.
- WOLLMAN, E.L., et JACOB, F. (1954) Lysogénie et recombinaison génétique chez E. coli K12. C.R. Acad. Sci., 239, 455-456.
- WOLLMAN, E.L., et JACOB, F. (1957) Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez E. coli. II. La localisation chromosomique du prophage λ et les conséquences génétiques de l'induction zygotique. Ann. Inst. Pasteur, 93, 323-339.
- WOLLMAN, E.L., et JACOB, F. (1958) Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez E. coli. V. Le mécanisme du transfert de matériel génétique. Ann. Inst. Pasteur, 95, 641-666.
- WOLLMAN, E.L., et JACOB, F. (1959) La sexualité des bactéries. Monographies de l'Institut Pasteur. Masson éd., Paris.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES	9
I - Souches de bactéries et de bactériophages	9
A. Souches bactériennes	11
B. Bactériophages	12
II - Milieux	14
III - Méthodes	14
A. Préparation des stocks de phages	15
B. Titrage des bactériophages	15
CHAPITRE II - ETUDE DE L'ORIGINE DU BACTERIOPHAGE P ₂ HYBRIDE	17
I - Propriétés comparées des bactériophages P ₂ et P ₂ Hybride	18
A. Propriétés qui apparentent P ₂ Hybride à P ₂	19
B. Propriétés qui distinguent P ₂ et P ₂ Hybride	21
II - Origine de P ₂ Hybride	23
A. Obtention du bactériophage P ₂ Hybride à partir de différents mutants du bactériophage P ₂	24
B. Obtention de phages P ₂ Hybride à partir de différentes souches d'E. coli B	27
III - Analyse quantitative de l'apparition du phage P ₂ Hybride	27
A. Cinétique d'apparition du phage P ₂ Hybride	28
B. Etude de la production des phages P ₂ Hybride par des bactéries individuelles	28
IV - Conclusion	30

CHAPITRE III - RECHERCHES SUR LA NATURE	
DU PROPHAGE X D'E. COLI B	31
I - Isolement de souches d'E. coli B	
dépourvues du prophage X	31
A. Isolement de souches B(X) ⁻ après	
action de la lumière ultra-violette	33
B. Isolement de souches B(X) ⁻ après	
infection d'E. coli B par les phages P ₂	34
II - Comparaison des propriétés des souches	
B(X) ⁺ et B(X) ⁻	36
III - Caractère défectif du prophage X	39
A. Recherche de bactériophages corres-	
pondant au prophage X	40
B. Analyse du caractère défectif du	
prophage X	41
IV - Conclusion	47
CHAPITRE IV - ETUDE DE LA DENSITE DES BACTERIOPHAGES	
P ₂ ET P ₂ HYBRIDE	48
I - Méthode d'étude et ses possibilités	50
A. Principe de la méthode	50
B. Séparation des fractions	50
C. Analyse des résultats	51
II - Résultats expérimentaux	53
A. Différence de densité entre les	
phages P ₂ et P ₂ Hybride	53
B. Comparaison des densités d'hybrides	
issus de multiples hybridations	56
III - Conclusion	59
CHAPITRE V - LA LOCALISATION GENETIQUE DU PROPHAGE X	62
I - Matériel et méthodes	64
A. Souches bactériennes	64
B. Méthodes	65

II → Croisements entre bactéries donatrices (X) ⁺ et bactéries réceptrices (X) ⁻	68
A. Isolement d'une souche Hfr(X) ⁺ , hybride d'E. coli K12 et d'E. coli B	68
B. Croisement entre la souche Hfr(X) ⁺ hybride et une souche K12 F ⁻	70
III - Croisements entre bactéries donatrices (X) ⁻ et bactéries réceptrices (X) ⁺	71
A. Croisements entre bactéries K12 Hfr P4x(X) ⁻ et bactéries réceptrices (X) ⁺	72
B. Croisements entre bactéries K12 Hfr H(X) ⁻ et bactéries F ⁻ (X) ⁺	73
IV - Conclusion	74
RESUME ET CONCLUSIONS	80
BIBLIOGRAPHIE	85

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

« Les données récentes sur le cycle du virus de Rous »

Vu et approuvé :

Paris, le 1^{er} Juin 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY.

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris.

Jean ROCHE.

